

SÉRIE A, N° 656

N° D'ORDRE

1401

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

H. COLIN

1^{re} THÈSE. — HYDROLYSE DE QUELQUES POLYSACCHARIDES PAR LE
BOTRYTIS CINEREA

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 26 janvier 1911, devant la Commission d'examen

MM. G. BONNIER.... *Président.*

WALLERANT.... }
G. BERTRAND... } *Examineurs.*

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

420, boulevard Saint-Germain, 420

1911

SÉRIE A, N° 656

N° D'ORDRE

1401

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

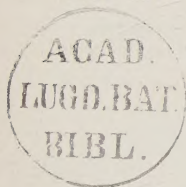
PAR

H. COLIN

1^{re} THÈSE. — HYDROLYSE DE QUELQUES POLYSACCHARIDES PAR LE
BOTRYTIS CINEREA

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 26 janvier 1911, devant la Commission d'examen



MM. G. BONNIER.... *Président.*
WALLERANT.... }
G. BERTRAND... } *Examineurs.*

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

420, boulevard Saint-Germain, 420

—
1911

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

MM.

Doyen.	P. APPELL, <i>Professeur.</i>	Mécanique rationnelle.
Doyen honoraire.....	G. DARBOUX —	Géométrie supérieure.
Professeurs honoraires..	L. TROOST. Ch. WOLF. J. RIBAN.	
	LIPPMANN.....	Physique.
	BOUTY.....	Physique.
	BOUSSINESQ.....	Physique mathématique et Calcul des probabilités.
	PICARD.....	Analyse supérieure et Al- gèbre supérieure.
	H. POINCARÉ.....	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
	Yves DELAGE.....	Zoologie, Anatomie, Phy- siologie comparée.
	G. BONNIER.....	Botanique
	DASTRE.....	Physiologie.
	KOENIGS.....	Mécanique physique et ex- périmentale.
	VÉLAIN.....	Géographie physique.
	GOURSAT.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
	CHATIN.....	Histologie.
	HALLER.....	Chimie organique.
	JOANNIS.....	Chimie (Enseign ^t P. C. N.)
Professeurs.....	JANET.....	Physique
	WALLERANT.....	Minéralogie.
	ANDOYER.....	Astronomie physique.
	PAINLEVE.....	Mathématiques générales.
	HAUG.....	Géologie.
	HOUSSAY.....	Zoologie.
	LE CHATELIER.....	Chimie.
	Gabriel BERTRAND...	Chimie biologique.
	Mme P. CURIE.....	Physique générale.
	CAULLERY.....	Zoologie, évolution des êtres organisés.
	C. CHABRIÉ.....	Chimie appliquée.
	G. URBAIN.....	Chimie.
	BOREL.....	Théorie des fonctions.
	MARCHIS.....	Aviation.
	Jean PERRIN.....	Chimie physique.
	G. PRUVOT.....	Zoologie, anatomie, phy- siologie comparée.
	N.....	Application de l'Analyse à la Géométrie.
	N.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
	PUISEUX.....	Mécanique et Astronomie.
	LEDUC.....	Physique.
	MATRUCHOT.....	Botanique.
Professeurs adjoints.....	MICHEL.....	Minéralogie.
	HÉROUARD.....	Zoologie.
	Léon BERTRAND.....	Géologie.
	Rémy PERRIER.....	Zoologie (Enseign ^t P. C. N.).
	MOLLIARD.....	Physiologie végétale.
	COTTON.....	Physique.
Secrétaire.....	D. TOMBECK.	

A

M. GASTON BONNIER

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA SORBONNE

Respectueux hommage



Digitized by the Internet Archive
in 2026

HYDROLYSE DE QUELQUES POLYSACCHARIDES PAR LE *BOTRYTIS CINEREA*

Par H. COLIN

INTRODUCTION

Malgré le nombre toujours croissant des recherches relatives aux diastases, les travaux méthodiques sur les dédoublements diastasiques effectués par un organisme en particulier, dans un groupe déterminé de substances, sont restés jusqu'à présent l'exception.

Quelques moisissures seulement ont été étudiées dans cet esprit ; il faut citer, en première ligne : le *Sterigmatocystis nigra* Van Tiegh. (*Aspergillus niger* Van Tiegh.), le *Penicillium crustaceum* Fr. (*Penicillium glaucum* Link) et, plus récemment, l'*Eurotiosis Gayoni* Cost. et le *Monilia sitophila* Sacc.

En général, la tendance à considérer les enzymes comme des réactifs spéciaux, la préoccupation de distinguer les diastases déjà connues et d'en créer de nouvelles ont souvent fait perdre de vue les problèmes, plus intéressants, de la physiologie générale, notamment la question des rapports entre les sécrétions diastasiques et l'utilisation des différentes substances dont peut se nourrir un organisme.

Ce sont ces problèmes de physiologie générale que j'ai eus en vue, en entreprenant l'étude comparée des dédoublements diastasiques effectués dans le groupe des sucres par une Mucédinée bien connue, le *Botrytis cinerea*, forme conidienne du *Sclerotinia Fuckeliana* Fuckel.

J'ai choisi à dessein cette moisissure très vulgaire, parce

que plusieurs particularités de sa physiologie m'étaient connues par des travaux antérieurs ; c'est un organisme très polyphage, capable, par conséquent, de se développer sur les substratums les plus divers, et remarquable, dès lors, par la multiplicité de ses actions digestives. Ce que l'on sait déjà des ferments élaborés par lui le présente comme un producteur d'enzymes beaucoup moins énergique que le *Sterigmatocystis nigra* ; à ce titre, il se rapproche davantage du plus grand nombre des Mucédinées.

J'ai commencé par cultiver le *Botrytis* sur les différents sucres dont j'ai fait l'étude, dans le but de suivre les transformations respectives de chacun d'eux au cours de la végétation.

Un second chapitre est consacré à la recherche des enzymes contenus dans les liquides fermentaires et dans les mycéliums.

J'ai examiné ensuite les rapports qui existent entre le sucre alimentaire et les diastases sécrétées.

Dans le dernier chapitre sont exposés les résultats concernant la spécificité des diverses diastases précédemment mises en évidence.

J'ai poursuivi ces travaux au laboratoire de Botanique de la Sorbonne, ainsi qu'au laboratoire de Biologie végétale de Fontainebleau.

Je remercie M. G. Bonnier de la bienveillance qu'il m'a constamment témoignée au cours de mes recherches ; je remercie également M. Dufour des facilités de travail qu'il m'a procurées au laboratoire de Fontainebleau. Je dois une reconnaissance toute spéciale à M. Molliard, qui a bien voulu s'intéresser à mes travaux et m'assister de ses conseils. C'est également pour moi un devoir d'exprimer ma profonde gratitude à M. C. Tanret, qui m'a laissé puiser largement dans sa riche collection d'hydrates de carbone, ainsi qu'à M. Hamonet, dont j'ai tant de fois mis à contribution l'expérience et l'inépuisable obligeance.

CHAPITRE PREMIER

LES CULTURES

SIGNIFICATION ET TECHNIQUE DES CULTURES

Pour se rendre compte de l'action exercée sur un polysaccharide par les diverses diastases d'une moisissure, il importe d'examiner tout d'abord si cette substance possède, à l'égard de l'organisme étudié, une valeur nutritive.

Ce résultat ne peut être obtenu qu'en essayant de cultiver la moisissure sur un milieu favorable dont l'élément hydrocarboné est représenté par le sucre soumis à l'expérience.

L'examen de ce milieu, aux différentes époques de la végétation, fournit des renseignements de première importance sur l'hydrolyse du polysaccharide introduit comme aliment : ou bien, en effet, les produits de dédoublement s'accumulent dans le liquide de culture, ou bien celui-ci ne renferme jamais, au cours de la végétation, d'autre élément hydrocarboné que le polyose primitivement introduit.

Dans le premier cas, il ne peut y avoir aucun doute sur l'élaboration, par l'organisme, d'une diastase susceptible d'agir efficacement sur le sucre étudié ; dans le second cas, il y a lieu de croire à l'assimilation directe de la substance introduite, tant qu'on n'a pas mis en évidence, par d'autres méthodes, la présence, à l'intérieur du mycélium, d'un ferment efficace vis-à-vis de cette substance.

D'autre part, l'étude des propriétés actives du liquide de culture, aux diverses phases du développement, permet de se faire une première idée sur la façon dont s'opère l'hydrolyse. Si, en effet, la diastase existe en abondance, dans le liquide de culture, au moment où le polyose est transformé en ses produits de dédoublement, on est évidemment en face d'un ferment facilement diffusible et l'on peut en conclure que l'inversion s'effectue au moins partiellement, à l'extérieur, dans le milieu nutritif,

sans préjudice de ce qui se passe à l'intérieur des cellules ; inversement, si la diastase n'apparaît jamais dans le liquide extérieur, l'hydrolyse préalable, si elle a lieu, ne peut être le fait que d'un ferment strictement endocellulaire.

Ces considérations m'ont déterminé à commencer l'étude des sucres dont je me suis occupé par l'examen des transformations qu'ils subissent lorsqu'on les introduit, comme aliment, dans les liquides de culture.

Certains sucres, toutefois, n'ont été mis à ma disposition qu'en quantité trop restreinte pour me permettre de les utiliser dans les cultures ; je me suis borné, dans ce cas, à étudier leur hydrolyse sous l'action de mycéliums venus sur d'autres sucres, autant que possible voisins des premiers.

*
* *

Les cultures étaient effectuées sur milieu Raulin ; les éléments de ce liquide, ainsi que je l'ai montré ailleurs (1), conviennent bien au *Botrytis cinerea*. Je me suis servi de vases à fond plat, soit matras de Fernbach, soit fioles d'Erlenmeyer.

Les procédés de stérilisation doivent varier, évidemment, avec les différents sucres. Le saccharose, stérilisé à l'autoclave en présence des autres éléments du liquide Raulin, s'intervertit partiellement, ce qui détermine une cause d'erreur appréciable, une petite quantité de sucre interverti existant dans le liquide de culture dès le début ; il est donc préférable de stériliser à la bougie les milieux renfermant du saccharose. Pour les autres sucres, maltose, lactose, dont la molécule s'hydrolyse plus difficilement, cet inconvénient n'existe pas et la stérilisation peut s'effectuer à l'autoclave. Toutefois, pour éviter toute altération des sucres, j'ai constamment usé de la précaution suivante : on fait une solution, à concentration double, des éléments du liquide Raulin, le sucre excepté, et on stérilise cette solution dans les matras de culture ; le sucre, dissous à concentration convenable, dans l'eau distillée, est stérilisé à part à l'autoclave dans de petits matras munis d'une tubulure

(1) H. Colin. *Rev. gén. de Bot.*, t. XXI, p. 97, 1909.

latérale ; après refroidissement, on introduit aseptiquement la solution sucrée dans les matras de culture.

Les spores servant à l'ensemencement provenaient de cultures du *Botrytis cinerea* sur carotte renouvelées assez souvent pour qu'on n'eût jamais à utiliser que des spores fraîches.

Après ensemencement, les matras de culture étaient placés à l'étuve de Roux réglée à 27-28°, ou quelquefois abandonnés à la température du laboratoire, lorsqu'il y avait intérêt à ralentir les phénomènes d'hydrolyse afin d'en mieux observer toutes les phases.

Pour suivre les transformations du sucre au cours de la végétation, on prélevait par intervalle, à l'aide d'une pipette stérile, une petite quantité du liquide de culture et l'on dosait la liqueur avant et après inversion. La plupart des dosages ont été effectués à la liqueur de Fehling, par la méthode de G. Bertrand ; il m'était impossible d'user du polarimètre, vu la faible quantité de liquide dont je disposais à chaque prélèvement. Lorsque, pour contrôler mes résultats, j'ai eu recours à l'examen polarimétrique, je disposais une série de cultures autant que possible comparables ; chacune de ces cultures, arrêtée au moment convenable, servait à un dosage. J'ai suivi la même méthode dans l'étude des propriétés actives des milieux nutritifs.

CULTURES SUR SACCHAROSE

De tous les sucres, le saccharose est un de ceux que les végétaux inférieurs, Bactéries, Levures et Mucédinées, assimilent avec le plus de facilité. Toutefois, il ne manque pas de Bactéries qui sont incapables de vivre aux dépens du sucre de canne : les Bactéries du vinaigre sont dans ce cas. Un grand nombre de Mucorinées se trouvent de même dans l'incapacité d'intervertir le saccharose ; on peut citer *Mucor Rouxii* Wehm., *Mucor circinelloides* Van Tiegh., *Rhizopus nigricans* Ehrb. Quant aux Mucédinées, elles utilisent généralement le saccharose, avec production rapide et abondante d'invertine ; il y a des exceptions cependant : c'est ainsi que l'*Eurotiopsis Gayoni* végétè

avec peine sur saccharose et n'élabore pas de sucrase (1).

Le *Botrytis cinerea* se conduit comme la plupart des Mucédinées : cultivé sur liquide Raulin pourvu de saccharose, il donne une toile mycélienne qui recouvre la surface totale du liquide nutritif ; cette toile, d'abord blanche, devient grise dans la suite et produit, vers la fin de la culture, des filaments fertiles portant des conidies. Le développement ne diffère donc pas essentiellement de la végétation sur liquide Raulin pourvu de glucose (2).

« Toutes les fois, remarquait Bourquelot dès 1883, qu'on a réussi à faire prospérer une moisissure dans un milieu renfermant du sucre de canne, on a constaté que le premier acte de cette moisissure était le dédoublement du sucre en glucose et lévulose, acte auquel succède la destruction profonde des deux derniers sucres (3). »

Le *Botrytis* ne fait pas exception ; les expériences qui suivent en font foi. On prépare une série de cultures sur saccharose et l'on prélève, par intervalles, environ 2 centimètres cubes du liquide nutritif ; on dose sur un centimètre cube le sucre réducteur présent dans la liqueur ; le second centimètre cube est traité par HCl à 12 p. 1000 au bain-marie à 100°, durant un quart d'heure, après quoi on fait le dosage.

Je donne, dans le tableau ci-dessous, les dosages se rapportant à deux cultures effectuées à la température du laboratoire.

CULTURE I

Intervalle des dosages :	Cuivre réduit par cc.	
	Avant inversion :	Après inversion :
Dosage initial.....	0 mg.	52 mg.
Après 5 jours.....	18 —	47 —
— 7 —	37 —	37 —
— 9 —	29 —	29 —
— 11 —	21 —	21 —

CULTURE II

Dosage initial	0 —	25 —
Après 5 jours.....	18 —	21 —
— 7 —	11 —	11 —

(1) Laborde. Recherches physiologiques sur une moisissure nouvelle, l'*Eurotiopsis Gayoni*. Thèse de doctorat ès sciences. Paris, p. 37, 1896.

(2) Voir H. Colin. *Loc. cit.*

(3) Bourquelot. *C. R.*, t. 97, p. 1322, 1883.

Le premier effort du Champignon consiste donc à faire passer le saccharose à l'état de sucre interverti ; à peine la concentration a-t-elle baissé de quelques milligrammes par centimètre cube, ce qui témoigne d'un faible développement de la moisissure, que déjà la totalité du saccharose est hydrolysée.

Les auteurs ont toujours été frappés de ce dédoublement rapide du saccharose réalisé par une quantité si minime de mycélium vivant. J'ai observé, en ce qui concerne le *Botrytis cinerea*, qu'au moment où l'hydrolyse est complète, la moisissure a acquis un développement correspondant à un poids sec de 0^{gr},5. C'est au cours de la différenciation de ce faible poids de mycélium que 12^{gr},5 de saccharose, répartis dans 250 centimètres cubes de liquide, ont été intégralement transformés en sucre interverti.

Sur divers organismes, la plupart des questions subsidiaires relatives à la production d'invertine et à l'hydrolyse du sucre de canne ont fait l'objet d'études nombreuses : influence de la concentration en sucre, en électrolytes, action de la température, de la lumière... etc. Une question reste toujours intéressante, celle de savoir où s'effectue l'inversion du saccharose : est-ce à l'intérieur des cellules ou bien au contraire au sein du liquide nutritif ?

Il faut d'abord écarter toute possibilité d'hydrolyse sous l'influence combinée de l'acidité du liquide de culture et de la température de l'étuve ; un milieu Raulin à saccharose, placé comme témoin à l'étuve à 27°, ne subit aucune altération, pendant le temps que les cultures voisines mettent à intervertir leur saccharose.

Une raison qui plaide en faveur de l'hydrolyse extra-cellulaire est tirée de l'action presque identique des solutions concentrées de glucose et de saccharose sur les cultures. E. Laurent a signalé des faits analogues dans ses recherches sur les Levures (1). Cette contradiction à la loi des coefficients isotoniques semble devoir s'interpréter par l'interversion au moins partielle du sucre de canne, antérieurement à sa pénétration dans les cellules ; d'autant plus que le maltose, dont l'hydrolyse ne s'effectue

(1) E. Laurent. Recherches physiologiques sur les Levures. *Annales de la Société belge de Microscopie* (Mémoires), t. XIV, p. 31, 1890.

certainement qu'à l'intérieur des filaments, ne présente pas cette exception aux lois de de Vries.

Mais c'est principalement à l'examen des propriétés actives du liquide de culture qu'il faut avoir recours dans la question qui nous occupe.

Les résultats classiques à ce sujet datent des travaux de Fernbach (1) sur le *Sterigmatocystis nigra*. Si l'on examine le liquide nutritif au point de vue de sa teneur en sucrase aux différentes phases de la végétation, on observe que l'invertine n'apparaît dans ce liquide qu'en petite quantité tant qu'il existe du saccharose à intervertir, de telle sorte que la sucrase présente dans le milieu est insuffisante à intervertir la totalité du sucre encore intact. Puis le ferment devient plus abondant à mesure que la culture vieillit ; le liquide présente son maximum d'activité lorsque le mycélium, ayant consommé tout le sucre mis à sa disposition, cesse de s'accroître et que les cellules, à moitié mortes, laissent diffuser à l'extérieur une partie des principes albuminoïdes qu'elles renferment. Du reste, ce maximum ne coïncide pas avec l'époque de la sporulation, ainsi que cela se passe pour le *Fusarium* étudié par Wasserzug (2).

Le *Botrytis* se conduit à peu près exactement comme le *Sterigmatocystis nigra*. A plusieurs reprises, j'ai recherché la sucrase dans le liquide nutritif en m'adressant soit à des cultures encore jeunes, soit à des cultures parvenues à la fin de leur développement ; les deux expériences qui suivent résument les résultats obtenus.

On décante le liquide nutritif d'une culture jeune et on en fait bouillir une partie pour supprimer toute possibilité d'une action diastasique ultérieure ; faisant ensuite l'examen polarimétrique, on trouve $\alpha = -20'$ pour le liquide bouilli aussi bien que pour le liquide cru. On introduit alors dans de petits matras jaugés 2 centimètres cubes d'une solution de saccharose, on complète à 25 centimètres cubes avec les liquides soumis à l'étude et on abandonne les matras à l'étuve

(1) Fernbach. Recherches sur la sucrase. *Thèse de doctorat ès sciences*, Paris, 1890.

(2) Wasserzug. *Annales Inst. Pasteur*, p. 525, 1887.

à 35°. A ce moment la déviation polarimétrique est égale à $+5^{\circ}44'$. En suivant de jour en jour l'expérience au polarimètre, on voit le pouvoir rotatoire des liquides non bouillis diminuer lentement. Après quatre jours, $\alpha = +18'$.

Au contraire, la déviation reste stationnaire dans les matras dont le liquide a été préalablement bouilli. Il y a eu dédoublement d'une partie du saccharose. Le liquide de culture possède donc une activité indéniable à l'égard du saccharose; l'hydrolyse toutefois est loin d'être complète, puisque, après quatre jours, la déviation est restée positive.

Si l'on répète l'expérience avec le liquide d'une culture âgée dont le sucre a complètement disparu, on obtient au contraire, en moins de 48 heures, l'hydrolyse complète du saccharose introduit.

La sucrase existe donc dans le liquide de culture, même au moment où s'effectue l'hydrolyse du saccharose, mais elle s'y trouve en petite quantité.

On peut s'en rendre compte d'une autre façon, en s'adressant à une culture à ses débuts, dans laquelle le saccharose commence à s'intervertir. Si l'on décante le liquide nutritif de cette culture, pour le séparer complètement du mycélium et qu'on le replace à l'éluve dans les mêmes conditions, après l'avoir additionné de NaF à 1 p. 100, on voit l'hydrolyse se poursuivre encore, puis s'arrêter avant d'être totale.

Si le liquide est pauvre en invertine dans les premiers jours de la culture, le mycélium, au contraire, en renferme des quantités notables. Il suffit de recueillir le premier duvet formé à la surface du milieu, de le dessécher à la température ordinaire et de l'introduire, après l'avoir pulvérisé, dans une culture à saccharose non encore ensemencée, pour observer l'hydrolyse presque complète du sucre de canne.

D'autre part, en faisant agir comparativement des poids égaux de mycélium jeune et de mycélium âgé à l'état de poudre fermentaire, on constate que l'activité du mycélium jeune est notablement plus considérable que celle du mycélium adulte.

On doit conclure de ces faits, en raison de la présence de l'invertine dans le milieu nutritif, qu'une partie du saccha-

rose est intervertie dans le liquide de culture lui-même ; mais la rapidité de l'hydrolyse, dans les premiers jours de la culture, indique qu'une quantité notable de sucre doit être dédoublée à l'intérieur des cellules.

L'expérience suivante, tout artificielle qu'elle soit, se prononce en faveur de cette interprétation. On fait une solution à 5 p. 100 de sucre de canne dans du liquide Raulin et on l'introduit dans une éprouvette de 15 centimètres de hauteur sur 6 de diamètre. On prépare par ailleurs une solution d'invertine dont on remplit la cavité d'une bougie poreuse d'alumine. On place la bougie à l'intérieur de l'éprouvette de façon qu'elle en occupe à peu près l'axe ; l'appareil est ensuite abandonné à l'étuve à 27° ; les conditions sont donc identiques à celles que l'on réalise pour les cultures. Vingt-quatre heures après, on dose, sur 2 centimètres cubes, le liquide extérieur à la bougie : on n'obtient que des traces de cuivre réduit ; au bout de trois jours, le dosage donne 20 milligrammes de cuivre et après cinq jours, on trouve 108 milligrammes. L'hydrolyse, lente à se mettre en train, fait donc, dès le quatrième jour, des progrès très rapides.

On se pose immédiatement la question suivante : la sucrase a-t-elle diffusé, à travers les pores de la bougie, dans le liquide extérieur ? Pour m'en rendre compte, je prélève 10 centimètres cubes de la liqueur et je les isole dans un matras jaugé à 10. Si le liquide renferme de l'invertine, le dédoublement du saccharose doit se poursuivre dans le matras. C'est, de fait, ce qui se passe ; le lendemain de cette opération on obtient 125 milligrammes de cuivre pour 2 centimètres cubes, trois jours après, on trouve 148 milligrammes. Pendant ce temps, l'inversion progresse également dans l'appareil, mais *plus rapidement* que dans le matras : aux dates correspondant aux dosages précédents, on a, en effet, pour le liquide resté en contact avec la bougie, respectivement 130 et 164 milligrammes de cuivre. Enfin, si l'on attend quelques jours encore, l'hydrolyse est totale aussi bien dans le matras que dans l'appareil.

On saisit bien ici la simultanéité des deux causes d'hydrolyse susceptibles d'intervenir lorsque les cellules se trouvent en contact avec un milieu pourvu de saccharose. D'une part,

l'invertine que renferment les cellules diffuse au travers des membranes et se répand dans le liquide extérieur; de l'autre, il s'établit, entre les contenus cellulaires et le milieu qui les baigne, des échanges au cours desquels le saccharose venu du dehors est transformé, dans les cellules, en sucre interverti dont l'excès passe dans le milieu de culture.

CULTURES SUR MALTOSE

Les Mucédinées utilisent généralement le maltose tout aussi bien que le saccharose : on connaît les résultats obtenus en culture sur maltose avec le *Sterigmatocystis nigra* (1), le *Penicillium crustaceum*, l'*Eurotiopsis Gayoni* (2), l'*Hormodendron Hordei* Bruhne (3), etc.

Le *Botrytis cinerea* se conduit de même ; ensemencées sur maltose, les spores germent normalement et donnent une toile mycélienne aussi abondante qu'en culture sur saccharose.

Mais tandis que le sucre de canne, dans les cultures, est généralement hydrolysé dès les premiers stades du développement, le maltose, au contraire, semble n'être dédoublé qu'au fur et à mesure des besoins de l'organisme. « La fermentation du maltose par la levure de bière, remarque Bourquelot, se déclare et s'achève sans qu'on puisse déceler, dans la solution, la présence du glucose... en sorte que les apparences sont pour une fermentation directe dans laquelle manquerait la phase de dédoublement (4). » Laborde relève la même observation dans les cultures d'*Eurotiopsis* : « Le maltose paraît être constamment seul dans le liquide, depuis le commencement jusque vers la fin de la consommation du sucre. »

C'est également ce que l'on constate avec le *Botrytis cinerea*. Le maltose possédant un pouvoir réducteur environ moitié moindre que celui du glucose résultant de son hydrolyse, il est possible, ici encore, de suivre avec une précision suffisante les

(1) Bourquelot. *C. R.*, XCVII, p. 1000, 1883; *Bull. soc. myc.*, IX, 1893; *Journ. de l'Anat. et de la Physiol.*, 1886, p. 192.

(2) Laborde. *Loc. cit.*, p. 30.

(3) Bruhne. *Zopf's Beiträge*, Heft IV, p. 1, 1894.

(4) Bourquelot. *C. R.*, XCVII, p. 1322, 1883.

transformations du maltose à l'intérieur du liquide de culture. Le dosage avant inversion fournit en effet un certain poids p de cuivre réduit ; après hydrolyse par un séjour de quatre heures au bain-marie à 100° en présence de HCl à 12 p. 1000, on obtient, au dosage, un poids de cuivre p' ; p' est supérieur à p tant qu'il existe, dans le milieu nutritif, du maltose encore intact ; la différence $p'-p$ permet évidemment de calculer la quantité de maltose non encore dédoublé, présent dans le liquide de culture au moment de chaque prélèvement.

Les tableaux ci-dessous se rapportent à des cultures dont les deux premières ont été effectuées à l'étuve à 26° , la troisième à la température du laboratoire.

CULTURE I

Intervalle des dosages :	Cuivre réduit par cc.	
	Avant inversion :	Après inversion :
Dosage initial.....	66 mg.	118 mg.
Après 4 jours.....	52 —	105 —
— 6 —	43 —	88 —
— 12 —	13 —	49 —

CULTURE II

Dosage initial.....	66 —	118 —
Après 6 jours.....	45 —	90 —
— 11 —	23 —	65 —

CULTURE III

Dosage initial.....	50 —	98 —
Après 5 jours.....	35 —	85 —
— 10 —	20 —	70 —

Ces dosages indiquent nettement que le glucose ne s'accumule pas dans le liquide nutritif au cours de la culture ; durant les premiers jours de l'expérience le rapport du cuivre trouvé avant inversion au cuivre trouvé après reste sensiblement constant et égal à 2 ; il augmente ensuite progressivement et devient supérieur à 3 vers la fin de la culture ; ce rapport tendrait vers l'unité si le maltose s'hydrolysait dans la culture.

Les cultures sur maltose présentent donc, vis-à-vis des cultures sur saccharose, une première différence essentielle : le *Botrytis* hydrolyse rapidement, dès les premiers stades de son développement, le saccharose mis à sa disposition ;

le maltose, au contraire, persiste tel jusqu'à la fin de la culture et disparaît lentement du milieu nutritif, sans subir, dans ce milieu, aucune hydrolyse.

Cette conclusion est confirmée par l'étude des osazones : en recueillant le liquide de culture aux différentes phases de la végétation et le traitant, après défécation, par l'acétate de phénylhydrazine, on n'obtient jamais d'osazone insoluble à chaud ; par refroidissement, il se forme un précipité abondant, soluble dans l'eau bouillante, dans l'alcool méthylique, fondant au bloc Maquenne à 206° et présentant les caractères microscopiques de la maltosazone.

J'ai essayé de me rendre compte de l'écart qui se manifeste, à la fin des cultures, entre les dosages avant et après hydrolyse. Dans ce but, j'ai recueilli le liquide d'une culture vieille de treize jours ; le dosage, pratiqué sur 10 centimètres cubes, a donné :

Avant hydrolyse.....	127 mg. de cuivre.	3
Après —	301 — —	4

En supposant que le chiffre obtenu dans le dosage antérieur à l'inversion soit relatif au maltose, il existerait dans la culture, au moment où on l'arrête, 117 milligrammes de maltose par 10 centimètres cubes de liquide.

Déterminons, d'après ces données, le pouvoir rotatoire ; nous trouvons : $[\alpha] = +192^{\circ}$, nombre bien supérieur au pouvoir rotatoire du maltose.

Si l'on prend, au contraire, le pouvoir rotatoire après inversion, alors qu'il n'y a plus, dans le liquide, que du glucose on trouve $[\alpha] = +53^{\circ}$, chiffre que l'on peut accepter.

D'autre part, la quantité de glucose trouvée après inversion, 161 milligrammes, est supérieure de 38 milligrammes à celle que donnent, par hydrolyse, 117 milligrammes de maltose.

Tout se passe donc comme s'il existait dans le liquide de culture — et en quantité toujours plus considérable à mesure que la végétation vieillit — une substance ne réduisant pas la liqueur de Fehling, possédant un pouvoir rotatoire dextrogyre supérieur à celui du maltose, et produisant, par hydrolyse, uniquement du glucose. Le liquide de culture ne

donnant pas avec l'iode de réaction caractéristique, on ne peut songer à la présence de dextrine, ni de glycogène. Il n'entrait pas dans mes préoccupations de faire une étude plus approfondie de cette particularité.

*
* *

On est en droit, désormais, de se poser la question de savoir si le maltose est assimilé *directement*, c'est-à-dire à l'état de maltose, par le *Botrytis*, ou s'il subit à l'intérieur des filaments mycéliens une hydrolyse préalable qui l'amènerait à l'état de glucose assimilé ensuite par le protoplasme.

L'absence constante de glucose dans le liquide de culture n'est pas une preuve suffisante en faveur de l'assimilation directe du maltose, car ce dernier pourrait être hydrolysé très lentement à l'intérieur des cellules, et le glucose résultant de l'hydrolyse, assimilé, au fur et à mesure de sa production, par le protoplasme.

Si l'on réussissait à caractériser le glucose dans le mycélium, on aurait un argument d'une certaine valeur en faveur de l'hydrolyse préalable du maltose. C'est la raison qui m'a déterminé à tenter l'expérience suivante :

On recueille le mycélium, on le broie au mortier, on traite ensuite la bouillie par l'alcool à 90° pour dissoudre les sucres; on filtre et on évapore l'alcool au bain-marie; le liquide résiduel est étendu d'eau distillée et traité par la phénylhydrazine acétique. Que l'on opère avec des mycéliums jeunes ou des mycéliums âgés, il ne se forme jamais d'osazone insoluble à chaud; par refroidissement, des cristaux abondants se déposent qui possèdent tous les caractères de la maltosazone.

Si donc du glucose prend naissance dans les filaments au cours de la culture, c'est d'une façon absolument transitoire et en si petite quantité qu'il est difficile de le mettre en évidence.

Dès lors, rien ne prouve, jusqu'à présent, que le maltose soit transformé en glucose avant d'être assimilé par la moisissure. Seule, l'étude des ferments contenus dans le mycélium, en

révéla la présence, dans les cellules, d'un ferment actif sur le maltose, pourra désormais donner la solution du problème. C'est du reste cette méthode indirecte qui a conduit Bourquelot à la conclusion que le maltose n'est assimilé par le *Sterigmatocystis nigra* qu'après hydrolyse préalable (1).

Activité du liquide de culture. — Tandis que les liquides nutritifs, dans les cultures de *Botrytis* sur saccharose, se montrent toujours actifs vis-à-vis du sucre de canne, faiblement au début des cultures, énergiquement à la fin, le liquide des cultures sur maltose ne possède, à aucun moment, la propriété d'hydrolyser le maltose, quand bien même on laisse vieillir la végétation jusqu'à épuisement complet du sucre et au delà.

Les liquides de culture ne fournissent donc aucun renseignement sur la présence d'une maltase à l'intérieur des filaments.

Le *Botrytis* se conduit, en cela, très différemment de l'*Eurotiosis Gayoni* et du *Sterigmatocystis nigra*; ces derniers, en effet, cultivés sur maltose, offrent des liquides de culture peu actifs vis-à-vis du maltose tant que le mycélium est jeune, très actifs au contraire à la fin de la végétation, lorsque le sucre est complètement épuisé et que les filaments se ramollissent.

CULTURES SUR RAFFINOSE

Le raffinose présente le plus grand intérêt, en raison de la complexité de son hydrolyse totale.

On sait que le raffinose est un triose non réducteur; son hydrolyse complète, sous l'action des acides minéraux étendus, à chaud, fournit un mélange, à parties égales, de lévulose, de glucose et de galactose. L'hydrolyse s'effectue en deux temps: au premier, qui correspond à l'inversion faible, on obtient un mélange de lévulose et de mélibiose de pouvoir rotatoire (+ 53° en moyenne) environ moitié moindre que le pouvoir rotatoire du raffinose; en prolongeant l'action de l'acide, le

(1) Bourquelot. *Journ. de l'Anat. et de la Physiol.*, p. 192, 1886.

mélibiose s'hydrolyse à son tour et donne une molécule de glucose et une molécule de galactose.

En laissant de côté, pour l'instant, toutes les questions relatives à la constitution du raffinose dans ses rapports avec les différents ferments qui pourraient intervenir lors de son hydrolyse, il importe de rechercher si, dans l'utilisation du raffinose par le *Botrytis*, on assiste à une hydrolyse préalable de ce triose et, dans ce cas, si l'hydrolyse passe par les deux stades caractéristiques de l'action des acides étendus.

L'intérêt qui s'attache à ces recherches n'est du reste pas exclusivement théorique, le raffinose se rencontrant dans un certain nombre de plantes : on l'a identifié dans les mélasses de sucrerie, dans les tourteaux de Coton, dans l'Orge et le Blé durant la période de germination, dans la manne de divers *Eucalyptus*... etc.

C'est principalement aux Levures qu'on s'est adressé pour étudier, en cultures, l'hydrolyse du raffinose. On sait, à ce sujet, que les diverses Levures se conduisent très différemment vis-à-vis du raffinose. En général, les Levures hautes ne fournissent, aux dépens du raffinose, que 18 p. 100 d'alcool, et, dans ce cas, l'alcool provient uniquement du lévulose détaché de la molécule de raffinose : ainsi s'expliquent les phénomènes de fermentation incomplète signalés par divers auteurs, notamment par Berthelot (1) et Loiseau (2). Au contraire, les Levures basses végétant sur le raffinose donnent environ 40 p. 100 d'alcool. Ces variations dans la production d'alcool ne peuvent provenir que de la diversité des actions diastasiques dont sont susceptibles les différentes Levures : les Levures hautes ne déterminent, en effet, qu'une inversion faible du raffinose et laissent par conséquent le mélibiose non fermenté ; les Levures basses, au contraire, provoquant l'inversion forte, font fermenter non seulement le lévulose, issu de l'inversion faible, mais encore les produits de dédoublement du mélibiose.

Went (3) a essayé des cultures sur raffinose du *Monilia sito-*

(1) Berthelot. *C. R.*, CIX, p. 548.

(2) Loiseau. *C. R.*, CIX, p. 614.

(3) Went. Ueber den Einfluss der Nahrung auf die Enzyymbildung (*Jahr. für wissensch. Bot.*, t. XXXVI, p. 640, 1901.

phila; il signale l'utilisation du sucre avec production, faible d'ailleurs, de raffinase.

J'ai entrepris des cultures méthodiques de *Botrytis cinerea* sur raffinose, dans le but de suivre les transformations de ce sucre, au cours de son utilisation par la moisissure.

Le produit dont je me suis servi présentait un pouvoir rotatoire égal à $+103^{\circ}8'$; déshydraté suivant la technique recommandée par Bourquelot (1), il perdait environ 15 p. 100 de son poids, il s'agit donc du raffinose à 5 molécules d'eau.

Pour la technique des cultures et la stérilisation en particulier, j'ai suivi la même méthode que dans les cultures sur maltose; les solutions aqueuses de raffinose étaient stérilisées à part, à l'autoclave, en vapeur fluante. Je me suis assuré qu'au cours de ce traitement, le raffinose ne subit aucun dédoublement.

L'aspect des cultures rappelle ce que l'on obtient avec le saccharose: les débuts de la végétation sont assez lents; puis il se forme à la surface du liquide une pellicule blanche qui s'épaissit et passe progressivement au gris-cendre; vers la fin, des filaments fertiles se dressent sur la toile mycélienne.

Théoriquement les seuls dosages à la liqueur cupropotasique ne suffisent pas à mettre complètement en évidence les transformations successives du raffinose à l'intérieur du liquide de culture. Le raffinose livre, en effet, au premier stade de son hydrolyse, du lévulose et du mélibiose dont le pouvoir réducteur est voisin de celui du maltose. Il est difficile dès lors de se rendre compte de la quantité de raffinose présente dans la culture, au moment de chaque prélèvement, puisque l'augmentation du pouvoir [réducteur, après inversion (2), peut provenir, à la fois, de l'hydrolyse du mélibiose et du dédoublement du raffinose encore intact. Les dosages avant et après inversion ne fournissent que deux équations qui ne permettent pas de déterminer les trois inconnues: hexoses, mélibiose, raffinose. D'ailleurs, il est impossible de faire

(1) Bourquelot. *Jour. de Pharm. et Chim.* [6], III, 1896.

(2) Pour obtenir l'hydrolyse totale, on introduit 4 cc. du liquide soumis à l'étude dans un matras jaugé à 10 cc.; on complète au trait de jauge avec HCl à 12 p. 1000 et on abandonne au bain-marie bouillant pendant deux heures et demie.

intervenir, à chaque dosage, des équations de polarimètre, les prélèvements étant insuffisants.

Ce qu'il faut demander aux dosages, c'est le rapport du cuivre obtenu après inversion au cuivre obtenu avant inversion; l'étude de ce rapport permettra, nous le verrons, de déterminer approximativement le degré atteint par l'hydrolyse.

Les doutes qui pourraient surgir, relativement à la marche de l'hydrolyse, seront, dans la plupart des cas, facilement dissipés par l'examen qualitatif du liquide de culture au moyen des osazones.

Voici les dosages se rapportant à quelques-unes de mes cultures sur raffinose :

CULTURE I

Intervalle des dosages :	Cuivre réduit par cc.	
	Avant inversion :	Après inversion :
Dosage initial.....	0 mg.	85 mg.
Après 2 jours.....	43 —	84 —
— 3 —	38 —	83 —
— 5 —	50 —	79 —
— 6 —	46 —	77 —
— 10 —	26 —	41 —
— 11 —	16 —	30 —
— 13 —	8 —	14 —

CULTURE II

Dosage initial.....	0 —	83. —
Après 3 jours.....	45 —	81 —
— 5 —	43 —	70 —
— 8 —	18 —	35 —

CULTURE III

Dosage initial.....	0 —	84 —
Après 3 jours.....	38 —	82 —
— 7 —	40 —	70 —
— 10 —	11 —	19 —

CULTURE IV

Dosage initial.....	0 —	83 —
Après 3 jours.....	44 —	82 —
— 8 —	21 —	39 —
— 12 —	0 —	0 —

CULTURE V

Dosage initial.....	0 —	84 —
Après 3 jours.....	43 —	83 —
— 5 —	45 —	70 —
— 10 —	10 —	19 —

De l'examen de ces tableaux se dégagent les considérations suivantes :

1° Il existe, depuis le début jusqu'à la fin de la culture, une différence entre la quantité de cuivre trouvée avant inversion et celle trouvée après ; c'est donc qu'à *aucun moment l'hydrolyse n'est complète* à l'intérieur du milieu de culture.

2° Les quantités de cuivre trouvées après inversion diminuent constamment, à partir du dosage initial, ce qui démontre l'utilisation du raffinose par la moisissure. La diminution est lente au début, lorsque la pellicule mycélienne s'organise en surface, puis rapide, lorsque la toile s'épaissit et grisonne.

3° La courbe des dosages avant inversion monte rapidement durant les premiers jours de la culture, passe par un maximum et s'abaisse ensuite doucement. Cette ascension brusque de la courbe, au début des cultures, correspond évidemment à une hydrolyse, au moins partielle, du raffinose, beaucoup plus rapide que ne l'est la consommation du sucre par la moisissure ; il en résulte que les produits de dédoublement, n'étant pas utilisés au fur et à mesure de leur mise en liberté, s'accumulent dans le liquide de culture.

Le parallélisme est donc complet entre les cultures sur saccharose et les cultures sur raffinose à leur début : dans l'un et l'autre cas, le premier effort de la Mucédinée a pour résultat de dédoubler rapidement ces deux sucres.

Relativement au raffinose, on doit se demander à quelle phase s'arrête cette hydrolyse du début. Le dédoublement n'est pas total puisque les dosages après inversion accusent une augmentation du cuivre réduit. Mais alors deux cas sont susceptibles de se présenter : ou bien une partie seulement du raffinose est hydrolysée à fond, de telle sorte qu'il y ait, dans le milieu, quatre sucres en présence, raffinose non encore touché, lévulose, glucose et galactose provenant du raffinose transformé ; ou bien, ce qui est plus probable, la totalité du raffinose a subi l'inversion faible, auquel cas on doit pouvoir caractériser le mélibiose à l'intérieur du liquide de culture.

Cette dernière interprétation est la vraie, l'examen des osazones le montre avec certitude.

Par traitement, à l'acétate de phénylhydrazine, du liquide de culture préalablement déféqué, il se forme, à chaud, une osazone insoluble; recueillie et purifiée, elle fond au bloc Maquenne vers 230° ; il s'agit donc bien de la glucosazone; d'autre part, la liqueur filtrée abandonne, par refroidissement, des flocons jaunes, confusément cristallins, qui se redissolvent intégralement à chaud. Ce précipité, purifié par recristallisation dans l'eau et desséché, fond, par une chauffe rapide, à $177-179^{\circ}$; autant de caractères qui se rapportent à l'osazone du mélibiose.

Il existe donc du mélibiose dans le liquide de culture et cela, dès le début, sitôt que le milieu manifeste des propriétés réductrices, ce qui entraîne la conclusion suivante : le *Botrytis cinerea* utilise le raffinose en le dédoublant tout d'abord en lévulose et mélibiose.

4° Les phénomènes sont tout différents dans la seconde phase de la végétation. A partir du sixième et du septième jour le mélibiose semble exister à peu près seul dans le liquide de culture. En effet, prenons dans le tableau relatif à la culture I, les chiffres correspondant aux trois derniers dosages; on a, pour le cuivre réduit avant inversion : 26, 16, 8 milligrammes. En supposant qu'il ne reste dans la culture que du mélibiose, calculons les quantités de cuivre qui seraient réduites par les produits de l'hydrolyse totale de ce mélibiose; nous trouvons : 47, 29, 15 milligrammes; ces chiffres, les deux derniers surtout, sont très voisins de ceux que donne l'expérience : 41, 30, 14.

D'autre part, si, vers le dixième jour de la culture, on soumet le liquide à l'épreuve des osazones, on n'obtient plus, à chaud, de précipité; par refroidissement, il se dépose de la mélibiosazone.

Enfin, en admettant que le sucre présent dans le liquide vers la fin de la culture est du mélibiose presque uniquement, on trouve, pour le pouvoir rotatoire, des nombres voisins de $+125^{\circ}$, ce qui convient à peu près au mélibiose.

On est donc autorisé à croire que le lévulose, rapidement mis en liberté dès le début de la culture, à la suite de l'hydrolyse faible du raffinose, est ensuite consommé à peu près intégra-

lement ; il arrive un moment où le mélibiose existe presque seul dans la culture ; il est dès lors utilisé par la moisissure et disparaît petit à petit. L'utilisation du mélibiose par le *Botrytis* s'effectue de telle sorte que jamais les produits d'hydrolyse, glucose et galactose, n'apparaissent dans le liquide de culture. Si donc le mélibiose subit, avant assimilation, une hydrolyse préalable, cette hydrolyse ne peut être qu'intracellulaire, et d'autre part très lente, puisque les produits de dédoublement sont utilisés au fur et à mesure de leur mise en liberté.

Tandis que la première phase des cultures sur raffinose, au point de vue de l'action diastasique du *Botrytis*, rappelait les cultures sur saccharose, la seconde phase se rapproche, au contraire, des cultures sur maltose.

Tout autres sont les résultats obtenus par Gillot (1) avec le *Penicillium crustaceum* cultivé sur liquide Raulin pourvu de raffinose.

Les deux phases signalées par moi, dans la transformation du raffinose, disparaissent complètement. Le raffinose est hydrolysé à fond dès le second jour de la culture. Il y a lieu de s'étonner de ces résultats. En effet, il ressort de l'inspection des tableaux de dosage, donnés par l'auteur, que les trois cinquièmes du raffinose présent au début de la culture (la concentration est de 2 grammes p. 100), sont consommés déjà 2 jours après l'ensemencement, alors que l'utilisation totale du raffinose demande 14 jours. On est habitué, cependant, à voir le sucre alimentaire disparaître lentement durant la période de germination.

On ne peut suspecter la pureté du produit employé, son pouvoir rotatoire étant égal à $+ 104^\circ$. Mais, dans l'étude préliminaire de ce produit, l'auteur remarque que l'action directe et immédiate des acides sur 1 gramme de raffinose « a donné $0^{\text{gr}},6066$ de glucose ». Or, après inversion forte, 1 gramme de raffinose ($\text{C}^{18}\text{H}^{32}\text{O}^{16} + 5 \text{H}^2\text{O}$) donne $0^{\text{gr}},909$ du mélange lévulose, glucose et galactose ; après inversion faible, au contraire, on obtient $0^{\text{gr}},303$ de glucose et $0^{\text{gr}},575$ de mélibiose. Ce dernier sucre possédant un pouvoir réduc-

(1) Gillot. *Bull. Acad. roy. Sc. Belgique*, p. 99, 1900.

teur qui n'est que la moitié de celui du glucose, on conçoit que Gillot ait pu dire que le raffinose, après action des acides, donne 0^{gr},6066 de *glucose*.

Les chiffres de dosage, rapportés par l'auteur au glucose, doivent donc l'être vraisemblablement au mélange de lévulose et de mélibiose, ce qui modifie notablement l'allure générale des résultats.

L'auteur fait, de plus, allusion à l'action hydrolysante de certains éléments du liquide de Raulin, tels, par exemple, que l'azotate d'ammoniaque, le sulfate de zinc, l'acide tartrique, sur le raffinose, indépendamment de tout dédoublement diastasique exercé par le *Penicillium*. Cependant, il est facile de se rendre compte que, dans les conditions où l'on expérimente, ces éléments n'ont aucune influence sur l'inversion du raffinose; un témoin non ensemencé, placé à l'étuve à 26°, n'accuse aucun dédoublement du sucre.

Activité diastasique du liquide de culture. — En raison même de ces deux phases par lesquelles passent les cultures sur raffinose, la recherche des ferments solubles contenus dans le liquide de culture est de la plus grande importance.

Les cultures précédentes sur saccharose nous ont habitués, en effet, à voir apparaître dans le milieu un ferment soluble lorsque les produits d'hydrolyse envahissent rapidement le liquide nutritif. Au contraire, il ressort des cultures sur maltose que le ferment est absent du milieu lorsque les produits d'hydrolyse font défaut dans le liquide de culture.

Si ces données sont susceptibles de généralisation, on doit s'attendre à trouver, dans le liquide des cultures sur raffinose, une diastase hydrolysant ce triose jusqu'au stade inversion faible, tandis que le ferment correspondant au mélibiose ne saurait jamais se rencontrer dans le liquide.

C'est, de fait, ce que révèle l'expérience.

A. Ferment relatif au raffinose. — J'ai fait une première série d'essais avec le liquide d'une culture âgée, parvenue à la fin de son développement, et dont le sucre était complètement absent. Deux séries de matras ont été préparés renfermant tous 3 centimètres cubes d'une solution de raffinose à 10 p. 100 additionnée de 20 centimètres cubes de liquide de culture

bouilli ou non. Après 5 jours d'abandon à l'étuve à 36° on dose sur 1 centimètre cube; les matras bouillis ne réduisent pas le Fehling, les autres donnent, par centimètre cube, 24^{mg},5 de cuivre. Il est facile de se rendre compte, d'après ces données, du degré d'hydrolyse provoqué par le liquide de culture. En effet, il existe dans les matras, par centimètre cube, 20 milligrammes de raffinose à 5 molécules d'eau; supposons que le raffinose ait subi l'inversion faible: il a produit, dans ce cas, 11^{mg},4 de mélibiose, qui sont susceptibles de réduire 12 milligrammes de cuivre et 6 milligrammes de lévulose auxquels correspondent 12^{mg},5 de cuivre; par conséquent, l'expérience fournit, pour le cuivre réduit total, un chiffre qui répond théoriquement à l'inversion faible.

Du reste, par traitement à la phénylhydrazine acétique, on recueille de la glucosazone et de la mélibiosazone.

Il se répand donc, dans le liquide de culture, au moins à la fin de l'expérience, un ferment, actif vis-à-vis du raffinose, et que Giaja (1) propose d'appeler *raffino-lévulase*.

J'ai répété l'expérience précédente avec le liquide de culture prélevé au début de la végétation, au moment où s'effectue l'inversion faible du raffinose. Je suis arrivé aux mêmes résultats.

B. Ferment relatif au mélibiose. — Quant au ferment correspondant au mélibiose (*mélibiase*), toutes les tentatives effectuées dans le but de le mettre en évidence à l'intérieur du liquide nutritif ne m'ont donné que des résultats négatifs.

Sur l'assimilation directe ou indirecte du mélibiose, il est donc impossible, jusqu'à présent, de se prononcer; ici, comme pour le maltose, l'étude des ferments contenus dans le mycélium pourrait *seule*, en révélant à l'intérieur des hyphes la présence d'une mélibiase non diffusible, montrer que le mélibiose subit, avant assimilation, une hydrolyse préalable.

(1) Giaja. Étude des Ferments des Glucosides et des Hydrates de Carbone chez les Mollusques et chez les Crustacés. *Thèse de doctorat ès sciences*, Paris, 1909, p. 198.

CULTURES SUR MÉLÉZITOSE

L'intérêt pratique qui s'attache à l'étude de ce sucre est peu considérable, le mélézitose ne se rencontrant que très accessoirement chez les végétaux ; ce n'est que dans certains produits d'exsudation qu'on a signalé sa présence : dans la manne de Briançon, dans la manne de Turkestan, dans la miellée du Tilleul.

Du point de vue théorique, au contraire, l'étude de l'utilisation du mélézitose par les organismes présente une certaine importance. Ce triose offre, comme le raffinose, deux phases d'hydrolyse : le premier effet des acides étendus est de détacher du mélézitose une molécule de glucose ; il reste alors un biose réducteur, le turanose, très voisin du maltose et de l'isomaltose ; si l'on continue l'action de l'acide, le turanose se dédouble à son tour et donne 2 molécules de glucose, en sorte que, au terme de l'hydrolyse forte du mélézitose, on n'obtient que du glucose.

Retrouverait-on, dans la consommation du mélézitose, ces deux phases d'hydrolyse ? D'autre part, les cultures sur mélézitose offriraient-elles, comme les cultures sur raffinose, une double allure, selon que l'on considère la culture à ses débuts ou au contraire vers la fin de son cycle ? Dans ce cas, le glucose détaché lors de l'hydrolyse faible s'accumulerait tout d'abord dans le liquide nutritif, ce qui donnerait à cette première phase l'aspect des cultures sur saccharose, tandis que le turanose serait ensuite hydrolysé lentement à la manière du mélibiose, sans que les produits d'hydrolyse apparussent en quantité appréciable dans la culture.

Au sujet des cultures sur mélézitose on ne possède que les documents relatifs à la Levure : on sait que le mélézitose ne fermente pas, que le mélange de glucose et de turanose qui résulte de son hydrolyse faible ne fermente qu'en partie (1).

Le produit qui m'a servi possédait un pouvoir rotatoire égal à $+ 89^\circ$; il ne donnait, par ébullition avec la liqueur de

(1) Alekhine. *Ann. Chimie et Phys.* (6), t. XVIII, p. 532.

Fehling, que des traces d'oxydure ; sa pureté était donc suffisante.

La technique des stérilisations est exactement celle que j'ai suivie dans les cultures sur raffinose.

Ensemencées sur milieu Raulin pourvu de mélézitose, les spores de *Botrytis* germent avec quelque retard si l'on se réfère à ce qui se passe dans les cultures sur saccharose ; il se forme assez tardivement, à la surface du liquide, une toile mycélienne qui se hérisse de filaments ramifiés presque tous stériles.

J'ai effectué les dosages successifs à la liqueur cupropotasique ; on rencontre, dans ces opérations, les mêmes difficultés que j'ai signalées au cours de l'étude du raffinose : le mélézitose, en effet, ne réduit pas la liqueur de Fehling ; mais le turanose, résultant, à côté du glucose, de l'hydrolyse faible du mélézitose, possède un pouvoir réducteur qui devient sensiblement double après transformation du triose en deux molécules de glucose. L'augmentation du pouvoir réducteur, après l'hydrolyse forte, peut donc tenir à deux causes : dédoublement du mélézitose, hydrolyse du turanose. Dans ces conditions, il est impossible de se rendre compte, par les seuls dosages au Fehling, des quantités de turanose et de mélézitose existant, à tout moment, dans le liquide de culture. Toutefois, ici comme dans le cas du raffinose, la comparaison des résultats obtenus dans les dosages, avant et après inversion, peut fournir des renseignements suffisamment précis sur l'hydrolyse du mélézitose et le mode d'utilisation de ce sucre par la moisissure (1).

Voici les dosages se rapportant à une des cultures effectuées sur mélézitose :

Intervalle des dosages :	Cuivre réduit par cc.	
	Avant inversion :	Après inversion :
Dosage initial.....	traces	85 mg.
Après 2 jours.....	18 mg.	83 —
— 4 —	39 —	78 —
— 6 —	38 —	50 —
— 8 —	8 —	10 —
— 9 —	0 —	0 —

(1) L'hydrolyse totale était réalisée en additionnant 1 centimètre cube du liquide de culture de 9 centimètres cubes de HCl à 12 p. 1000 et abandonnant au bain-marie bouillant durant une heure et demie. D'après Alekhine, « il suffit de chauffer pendant dix minutes une dissolution de mélézitose avec

De ce tableau se dégagent les conclusions suivantes :

1° Si l'on considère la courbe des dosages avant inversion, on voit que le pouvoir réducteur du liquide augmente rapidement dès les premiers jours. C'est donc que le mélézitose est hydrolysé et que ses produits de dédoublement s'accumulent dans la culture.

De quelle nature est cette hydrolyse? S'agit-il de l'inversion faible, auquel cas il existerait, dans le liquide nutritif, simultanément du glucose, du turanose et du mélézitose? S'agit-il au contraire de l'inversion forte, et alors il n'existerait dans le liquide, tant qu'il persiste du mélézitose, que du glucose et du mélézitose, sans que jamais le turanose fût présent en quantité appréciable?

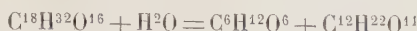
Il est impossible de répondre à cette question par l'examen des osazones; le mélézitose, en effet, par traitement à la phénylhydrazine acétique, donne un mélange de glucosazone et de turanosazone, l'acide acétique du réactif déterminant l'hydrolyse faible du triose; par conséquent, qu'il y ait du turanose ou du mélézitose dans le liquide de culture, on obtiendra, en toute hypothèse, un mélange de glucosazone et de turanosazone.

2° Vers le milieu de la culture, entre le quatrième et le sixième jour, le cuivre reste sensiblement constant dans les dosages avant inversion, pendant qu'il diminue rapidement dans les dosages après inversion. Durant cette phase, l'organisme fait une abondante consommation du sucre, sans que le pouvoir réducteur du liquide subisse aucune baisse. L'interprétation de ces faits est évidente: à mesure que le glucose disparaît, utilisé par la moisissure, les sucres non encore hydrolysés, soit mélézitose, soit turanose, achèvent de se dédoubler; de nouvelles quantités de glucose sont ainsi mises en liberté qui maintiennent le pouvoir réducteur constant.

3° Dès le sixième jour, le rapport des deux dosages avant et après inversion devient $\frac{38}{50} = 0,76$. Ce rapport indique net-

S^0H^2 très dilué pour que le pouvoir rotatoire prenne la valeur $[\alpha] = + 63^{\circ}8'$; une heure après, il devient égal à $+ 53^{\circ}$, pouvoir rotatoire spécifique du dextrose; après quoi, il ne change plus. » Alekhine. *Ann. de Chim. et de Phys.* (6), t. XVIII, p. 533.

tement que, dans le liquide de culture, le glucose et le turanose ne se trouvent pas dans la proportion qui correspondrait à l'inversion faible du mélézitose d'après l'équation :



En effet, le turanose acquiert un pouvoir réducteur sensiblement double en se transformant par hydrolyse en deux molécules de glucose ; le rapport des dosages avant et après inversion pour un mélange équimoléculaire de glucose et de turanose est donc très voisin de $\frac{2}{3}$.

En présence de ces données, on doit présumer que le glucose résultant de l'inversion du turanose s'accumule dans le liquide de culture. Cette conclusion se trouve justifiée par le dernier examen du liquide, le rapport des dosages avant et après inversion devenant égal à $\frac{4}{5}$.

Les cultures sur mélézitose présentent donc une première phase qui rappelle le début des cultures sur raffinose ; la moisissure commence, en effet, par dédoubler le mélézitose assez rapidement pour que les produits d'hydrolyse se manifestent en abondance dans le liquide de culture.

La seconde phase, au contraire, ne ressemble pas autant à la phase correspondante des cultures sur raffinose ; le glucose résultant de l'inversion du turanose apparaît dans le milieu nutritif, tandis que jamais ce liquide ne contient aucun des produits d'inversion du mélibiose.

Activité diastasique du liquide de culture. — Le liquide de culture, examiné après que la totalité du sucre a disparu, se montre capable d'hydrolyser le mélézitose jusqu'au stade inversion faible caractérisé par la présence du glucose et du turanose ; le dédoublement ne va pas au delà.

CULTURES SUR LACTOSE

J'ai obtenu, avec le saccharose et le maltose, deux types de culture très différents, tant au point de vue de la présence,

dans le liquide, des produits de dédoublement, que sous le rapport de la diffusion des ferments ; j'ai montré ensuite que les cultures sur raffinose répètent successivement, au cours de leur développement, les deux types précédents. Pour donner à ces premiers résultats un caractère plus général, je me suis appliqué à l'étude, en cultures, de plusieurs autres sucres, essayant de rapporter leur mode d'utilisation soit à celui du saccharose, soit à celui du maltose.

Je me suis adressé tout d'abord au sucre de lait. On possède, sur l'utilisation de ce sucre par les végétaux inférieurs, des renseignements suffisamment étendus.

On sait que les Bactéries consomment généralement le lactose.

Les Levures ordinaires n'attaquent pas le sucre de lait, ainsi que l'a établi Duclaux ; cependant, dès 1887, cet auteur décrit une Levure plus petite que les autres, capable de fournir de l'alcool et de l'acide carbonique aux dépens du lactose (1). Depuis lors, Kayser a étudié trois Levures se développant très bien dans un milieu nutritif formé de lactose et de bouillon Liebig (2). On sait, d'autre part, que le *Sacch. Kefyr* Beyer, le *Sacch. Tyrocola* et d'autres sont susceptibles d'utiliser le sucre de lait, avec production parfois abondante de lactase.

Un certain nombre de moisissures réussissent également à végéter aux dépens du lactose : l'*Oidium lactis* Sacc., l'*Hor-modendron Hordei*, par exemple, tandis que d'autres, telles que le *Mucor racemosus* Fres., refusent de se développer dans ces conditions.

Pour ce qui est du *Sterigmatocystis nigra*, « avec le sucre de lait, la germination des spores ensemencées, si rapide et si régulière avec le sucre candi, demeure rudimentaire. Les tubes mycéliens restent grêles et courts. Au lieu de former un feutrage épais couvert d'une forêt de tubes sporifères, ils forment, dans les cas les plus favorables, des îlots séparés où les fructifications sont rares ou absentes. En somme, au moins pour cette phase de la végétation, le sucre de lait

(1) Duclaux. *Ann. Inst. Pasteur*, I, p. 573, 1887.

(2) Kayser. *Ann. Inst. Pasteur*, V, p. 395, 1891. Voir aussi Mazé. Quelques nouvelles races de levures de lactose, *Ann. Inst. Past.*, XVII, 1903, p. 41.

n'est nullement l'équivalent du sucre candi (1) ». Mais si l'on fait pousser, à l'aide du sucre candi, une végétation abondante, et qu'alors on remplace ce sucre par du lactose, le *Sterigmatocystis* utilise le sucre de lait, bien que le développement soit moins satisfaisant qu'avec le saccharose.

Pottevin (2), en 1903, a répété l'expérience : transportant sur du liquide Raulin au lactose un mycélium de *Sterigmatocystis nigra* venu sur saccharose, il a vu le lactose disparaître progressivement de la culture, sans que jamais, du reste, le liquide nutritif renfermât trace de lactase.

Les cultures d'*Eurotiosis Gayoni* (3) sur lactose présentent également des particularités intéressantes. Cette Mucédinée se développe très mal sur liquide Raulin au lactose ; il est possible, toutefois, de rendre la végétation plus facile, en se servant, pour préparer la solution nutritive, non pas d'eau pure, mais d'un liquide tel que l'eau de levure ou le bouillon Liebig, ou encore, ce qui est plus remarquable, en abaissant à 1 gramme d'acide tartrique par litre l'acidité du liquide Raulin. Ce dernier résultat est interprété par Laborde de la façon suivante : l'acidité du milieu Raulin normal est trop élevée pour permettre le bon fonctionnement de la lactase différenciée à l'intérieur des hyphes et grâce à laquelle le lactose passe à l'état de glucose et de galactose, mélange qui constitue un aliment excellent pour l'*Eurotiosis*.

Au contraire, le lactose est un aliment convenable pour le *Botrytis cinerea*. Sans doute, les débuts du développement sont plus lents qu'avec le saccharose, mais dès qu'il s'est formé, en surface, une légère pellicule, le mycélium s'accroît normalement et donne un feutrage vigoureux dont le poids sec est peu inférieur à celui du mycélium venu sur saccharose dans les mêmes conditions. L'examen microscopique des filaments, tant au début que vers la fin de la culture, ne montre du reste aucune différence morphologique appréciable entre les filaments mycéliens venus sur lactose et ceux qui se différencient dans les cultures à saccharose ou à maltose.

(1) Duclaux. *C. R. Soc. Biol.*, février 1885.

(2) Pottevin. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVII, p. 31, 1903.

(3) Laborde. *Loc. cit.*, p. 42.

Pour suivre les transformations du lactose à l'intérieur du liquide de culture, il faut être à même de doser le lactose en présence de ses produits de dédoublement, glucose et galactose. Cette opération présente des difficultés sérieuses, sur lesquelles les auteurs ont fréquemment attiré l'attention (1).

Les dosages à la liqueur cupropotassique sont rendus délicats par ce fait que le lactose possède un pouvoir réducteur égal aux deux tiers environ du pouvoir réducteur de ses produits d'hydrolyse. Dans ces conditions, ainsi que le montre Giaja, pour une solution à 2 p. 100 de lactose hydraté, une inversion de 20 p. 100 se traduit par une différence de 1 centimètre cube dans le permanganate employé si l'on effectue le dosage sur 4 centimètres cubes. Cette différence est évidemment peu éloignée des erreurs d'expérience.

Si l'on adopte la méthode d'Allihn, qui consiste à réduire l'oxydure recueilli pour peser ensuite à l'état de cuivre métallique, Brachin fait voir qu'il est très difficile d'obtenir des résultats concordants à 4 milligrammes près : l'erreur est donc au moins aussi considérable que dans le procédé Bertrand.

Le polarimètre ne donne pas une précision plus grande ; le pouvoir rotatoire du lactose ($+ 52^\circ$) est, en effet, très voisin de celui du mélange glucose + galactose ($+ 66^\circ$). Pour la concentration de 2 p. 100 de lactose, on ne peut pas mettre en évidence, par cette méthode, une hydrolyse de moins de 20 p. 100.

Il n'est pas jusqu'à la méthode qualitative des osazones qui ne soit sujette à critique, les osazones du glucose et du galactose étant solubles à chaud dans une certaine proportion de lactosazone.

Il existe également une méthode cryoscopique énoncée par V. Henri et Ch. Marie ; elle présente à peu près le même degré de sensibilité que la méthode polarimétrique.

Enfin, Brachin a inauguré une méthode iodométrique qui vaut, en précision, les méthodes précédentes.

La seule méthode qu'il me fût possible d'employer, ici comme auparavant, était la méthode à la liqueur cupropotas-

(1) Voir notamment : Brachin. *Thèse de Pharmacie*, Paris, 1904, p. 9 ; Giaja. *Loc. cit.*, p. 131 ; Laborde. *Loc. cit.*, p. 47.

sique. C'est par ce procédé qu'ont été obtenus les résultats ci-dessous relatifs à deux cultures sur lactose :

CULTURE I

Intervalle des dosages :	Cuivre réduit par cc.	
	Avant inversion :	Après inversion :
Dosage initial.....	32 mg.	48 mg.
Après 6 jours.....	30 —	43 —
— 8 —	23 —	32 —

CULTURE II

Dosage initial.....	48 —	70 —
Après 6 jours.....	46 —	67 —
— 8 —	40 —	56 —

Il n'y a pas intérêt à poursuivre plus longtemps l'examen du liquide, les dosages perdant rapidement de leur précision lorsque la concentration en sucre diminue.

Il existe donc toujours une différence notable entre la quantité de cuivre trouvée avant inversion et celle trouvée après. D'ailleurs, le rapport des poids de cuivre trouvés après et avant inversion reste sensiblement le même pour tous les dosages, ce qui conduit à penser que le lactose existe constamment seul dans le liquide de culture. S'il en est ainsi, passant, par le calcul, du cuivre au lactose, puis, du lactose au mélange de glucose et de galactose qui résulterait théoriquement de l'hydrolyse du lactose, on devrait trouver des chiffres se rapprochant des résultats fournis par l'expérience ; c'est, en fait, ce que l'on constate, comme le montrent les tableaux suivants :

CULTURE I

Intervalle des dosages :	Lactose anhydre par cc. :	Glucose + Galactose :	
		calculés	trouvés.
Dosage initial.....	23 mg.	24,1	24,5
Après 6 jours.....	21 —	22	22
— 8 —	16 —	16,8	16,5

CULTURE II

Dosage initial.....	35 —	36,7	36,5
Après 6 jours.....	33 —	34,6	34,5
— 8 —	28 —	29,4	28

Les produits de l'hydrolyse du lactose sont donc constamment absents du liquide de culture. C'est là un fait fréquem-

ment observé dans les cultures de divers organismes sur lactose : l'*Eurotiosis Gayoni*, le *Bacillus coli* cultivé par Brachin, les Levures de lactose désignées par Kayser sous les lettres *b* et *c*, se conduisent, à cet égard, de la même manière que le *Botrytis cinerea*.

Les cultures de *Botrytis* sur lactose réalisent donc le type des cultures sur maltose. Pour le lactose comme pour le maltose, il est permis de se poser la question de savoir s'il est assimilé directement ou après hydrolyse.

En raison de la solubilité, à chaud, des osazones du glucose et du galactose dans la lactosazone, je n'ai pas tenté de caractériser le glucose et le galactose à l'intérieur des filaments mycéliens; ces sucres, s'ils prennent naissance dans le mycélium, ne s'y trouvent qu'en très faible quantité et disparaissent par consommation, au fur et à mesure de leur mise en liberté.

Activité diastasique du liquide de culture. — A quelque moment qu'on examine le liquide des cultures, on le trouve inactif vis-à-vis du sucre de lait. La lactase, si elle existe à l'intérieur des cellules, est donc extrêmement peu diffusible.

CULTURES SUR TRÉHALOSE

Le tréhalose est extrêmement répandu parmi les Champignons; on le trouve non seulement chez les Basidiomycètes, mais également chez plusieurs moisissures et même chez les Myxomycètes.

L'étude de l'utilisation de ce sucre présente donc un intérêt pratique considérable.

On sait qu'un grand nombre de Levures jouissent de la propriété d'hydrolyser le tréhalose; souvent aussi les Bactéries ont ce pouvoir.

Parmi les moisissures, deux organismes ont été surtout étudiés en vue de résoudre le problème de l'assimilation du tréhalose : l'*Eurotiosis Gayoni* et le *Monilia sitophila*.

D'après Laborde (1), l'*Eurotiosis* se développe très bien sur

(1) Laborde. *Loc. cit.* p. 52.

liquide Raulin pourvu de tréhalose, surtout si l'on diminue l'acidité ordinaire du milieu nutritif. Au cours du développement de la moisissure, le liquide de culture devient réducteur, le glucose résultant de l'hydrolyse du tréhalose apparaît donc dans le milieu; celui-ci, du reste, est capable de provoquer, en dehors de la vie de la plante, le dédoublement du tréhalose.

Les résultats obtenus par Went (1) avec le *Monilia sitophila* sont conformes aux précédents en ce sens que le liquide de culture devient réducteur; ils en diffèrent toutefois pour ce qui est de la présence de tréhalase à l'intérieur du milieu nutritif; en effet, ce liquide ne possède à aucun moment le pouvoir d'hydrolyser le tréhalose.

En cultivant le *Botrytis cinerea* sur tréhalose, je suis arrivé à des conclusions plus éloignées encore de celles de Laborde.

La technique des cultures et des stérilisations en particulier, est identique à celle que j'ai suivie pour les cultures sur maltose et sur lactose. J'ai employé constamment le liquide Raulin ordinaire sans faire varier son acidité, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les différents sucres.

Les spores fraîches de *Botrytis*, déposées sur le milieu nutritif, germent avec lenteur; il se forme cependant, en surface, une pellicule hyaline qui s'épaissit peu à peu; mais le développement est très ralenti si on le compare au développement obtenu dans une culture parallèle sur saccharose.

J'ai suivi comme à l'ordinaire, au moyen des dosages à la liqueur cupropotassique, les transformations successives du sucre au cours de la végétation. Les indications fournies par les dosages avant et après (2) inversion sont consignées dans le tableau suivant :

Intervalle des dosages :	Cuivre réduit par cc.	
	Avant inversion :	Après inversion :
Dosage initial.....	0 mg.	80 mg.
Après 7 jours.....	0 —	78 —
— 9 —	0 —	75 —
— 13 —	0 —	65 —
— 18 —	0 —	52 —

Le tréhalose est donc consommé avec une extrême lenteur.

(1) Went. *Loc. cit.*, p. 639.

(2) L'inversion était effectuée au bain-marie bouillant, en présence d'acide sulfurique à 6 p. 100. On prolongeait la chauffe pendant trois heures.

D'autre part, jamais le liquide nutritif ne renferme trace de glucose; c'est la preuve de l'absence rigoureuse, dans ce liquide, d'un enzyme hydrolysant le tréhalose.

En conséquence, les cultures seules sont incapables de nous renseigner sur l'assimilation directe ou indirecte du tréhalose par le *Botrytis*; elles nous apprennent uniquement que si la tréhalase est élaborée par la Mucédinée, ce ferment est strictement endocellulaire.

*
* *

Il est donc possible de ramener à deux types toutes les cultures précédentes.

Les cultures sur saccharose et sur raffinose réalisent un premier type caractérisé par l'apparition dans le milieu nutritif des produits de dédoublement ainsi que d'une diastase capable de transformer le saccharose en sucre interverti et le raffinose en un mélange de lévulose et de mélibiose.

Au contraire, dans les cultures sur maltose, sur lactose, sur tréhalose et sur mélibiose, les produits de dédoublement, aussi bien que les enzymes correspondant à chacun de ces sucres, sont constamment absents du liquide de culture.

Ce dernier cas, pour ce qui est du *Botrytis cinerea*, se présente comme le plus général.

A s'en tenir au seul examen du liquide de culture il semble donc que la plupart des sucres utilisés par le *Botrytis* sont assimilés directement.

Nous verrons cependant, au chapitre suivant, qu'en réalité ces sucres, maltose, lactose, etc., subissent, à l'intérieur du mycélium, une hydrolyse préalable.

Et ceci démontre suffisamment la nécessité de joindre à l'étude des liquides de culture l'examen des mycéliums eux-mêmes.

CHAPITRE II

**LIQUIDES FERMENTAIRES. — EXTRAITS MYCÉLIENS. —
POUDRES FERMENTAIRES**

Les liquides de culture sont généralement souillés d'un grand nombre d'impuretés : lorsqu'on les recueille, à la fin du cycle de la végétation, l'aliment hydrocarboné fait sans doute complètement défaut, mais une quantité notable de matières albuminoïdes s'est répandue dans le liquide, à la faveur du vieillissement des cellules ; de plus, il subsiste toujours à l'intérieur des milieux de culture une forte proportion de sels minéraux qui n'ont pas été absorbés par la plante. Toutes ces impuretés, tant à cause de leur présence même, qu'en raison des quantités variables qu'en contiennent les différentes cultures, constituent un obstacle à la réalisation d'expériences rigoureuses sur l'activité comparée des liquides de culture.

Il est donc nécessaire d'avoir des solutions fermentaires aussi exemptes que possible d'impuretés.

La méthode la plus simple pour obtenir ces liquides actifs est celle indiquée depuis longtemps par Duclaux. On arrête une culture au moment favorable, le plus souvent lorsque la végétation touche à sa fin, la perméabilité des membranes étant plus grande à ce moment. On siphonne le liquide de culture, on lave avec de l'eau distillée et après un contact d'une heure, on remplace ces eaux de lavage par une nouvelle quantité d'eau distillée ; on abandonne la macération à température favorable pendant le temps voulu, parfois un jour ou deux. Le liquide préparé de la sorte est suffisamment exempt d'impuretés.

Cette méthode classique est évidemment susceptible de modifications innombrables : divers électrolytes peuvent être introduits dans l'eau d'extraction ; l'eau de macération peut être rendue acide ou alcaline ; on peut enfin substituer à l'eau distillée différents véhicules, chloroforme, glycérine, hydrate de chloral, etc.

Ce procédé, qui réussit le plus souvent avec les moisissures,

peut être insuffisant pour extraire certains ferments d'un organisme déterminé, soit que les membranes des diverses Mucédinées ou Levures possèdent une perméabilité variable, soit que les différentes diastases ne diffusent pas avec la même facilité au travers de ces membranes. Le *Monilia candida* Bonord., par exemple, traité par la méthode de Duclaux, n'abandonne pas trace d'invertine.

Force est alors de recourir à des procédés plus énergiques et de broyer le mycélium, soit au mortier, soit à la molette, en présence de poudre de verre ou d'émeri, avant de le mettre à macérer : on obtient ainsi un *extrait* contenant toutes les diastases du *liquide fermentaire*, et susceptible en outre d'en renfermer d'autres qui, en raison de leur faible diffusibilité, n'ont pu passer, avant broyage du mycélium, dans l'eau de macération. Pour reprendre l'exemple précédent, le *Monilia candida* après broyage des cellules livre sa sucrase à l'eau distillée.

Cette méthode est elle-même parfois impuissante à révéler, dans le mycélium, l'existence de certains ferments auxquels divers auteurs donnent le qualificatif d'*insolubles*. Il reste alors, comme dernière ressource, de s'adresser, pour la mise en évidence de ces ferments, au mycélium lui-même, amené, par la méthode de Bourquelot, à l'état de « poudre fermentaire ». Le procédé consiste à écraser les tissus et à les abandonner à la dessiccation, après épuisement à l'alcool, en ayant soin de ne pas atteindre la température de destruction du ferment.

J'expose, dans ce chapitre, ce qui concerne l'activité diastatique comparée des liquides fermentaires, des extraits mycéliens et des poudres fermentaires se rapportant aux mycéliums venus sur les différents sucres étudiés au chapitre précédent. J'étends, de plus, ces résultats à certains sucres, tels que le stachyose, le gentianose que je n'ai pu observer en cultures, en raison de la petite quantité de substance dont je disposais.

Cette étude est indispensable à bien des points de vue. Pour plusieurs sucres, maltose, lactose, mélibiose, l'examen des liquides de cultures ne conduit qu'à des renseignements purement négatifs au sujet des diastases qui peuvent entrer en jeu au cours de leur assimilation, les liquides de cultures ne renfermant ni les produits d'hydrolyse, ni les ferments cor-

respondant à ces sucres. Dans ce cas, seule, la recherche des propriétés actives du mycélium lui-même permet de savoir si les sucres en question sont assimilés directement ou après hydrolyse.

D'autre part, si l'intérêt primordial des études sur les diastases résulte de la démonstration de ce fait que les dédoublements opérés par un organisme peuvent être répétés en dehors de lui au moyen de solutions diastasiques, il n'est pas évident que *tous* les dédoublements dont un organisme est le siège puissent être reproduits, avec la même facilité du moins, par les liquides diastasiques. Je montrerai, par exemple, que la maltase et la mélibiose du *Botrytis*, contrairement à l'invertine, ne passent qu'avec la plus grande difficulté dans les différents véhicules de macération.

Embrassant ainsi, par une vue d'ensemble, ce qui a rapport aux transformations des sucres à l'intérieur des milieux de culture, à l'activité fermentaire de ces milieux et à celle du mycélium, on pourra peut-être grouper autour d'un très petit nombre de types les différentes diastases étudiées.

SACCHAROSE

1° *Liquide fermentaire.* — Généralement les moisissures et les Levures mises à macérer dans l'eau abandonnent, avec la plus grande facilité, la sucrase qu'elles renferment.

Il existe toutefois un certain nombre d'exceptions : j'ai cité déjà le cas du *Monilia candida*; Duclaux (1) signale plusieurs Levures qui se conduisent de la même façon.

Chaque fois qu'un organisme, au cours de son développement, laisse diffuser, dans le milieu de culture, une diastase quelconque, il faut s'attendre à obtenir aisément, par simple macération aqueuse, une solution très active de cette diastase.

Le liquide fermentaire de *Botrytis cinerea*, sans être aussi riche en invertine que la macération de *Sterigmatocystis nigra*, hydrolyse cependant le saccharose avec assez de rapidité comme le prouve l'expérience suivante.

(1) Duclaux. *Microbiologie*, t. II, p. 498.

On prépare le liquide fermentaire en s'adressant à un mycélium cultivé sur saccharose et parvenu à la fin de son développement ; on soumet à l'ébullition une partie du liquide et l'on ajoute aux liqueurs, bouillies ou non, une même solution de saccharose ; on place les matras d'expérience à l'étuve à 37° pendant 24 heures, après quoi on dose, sur un centimètre cube, le liquide de chaque matras. Voici les résultats exprimés en cuivre :

	Cuivre par cc.	
	Avant inversion :	Après inversion :
Matras non bouilli.....	90 mg.	94 mg.
Matras bouilli.....	40 —	95 —

L'inversion est donc pratiquement complète dans les matras à liquide fermentaire non bouilli.

Pour me rendre compte de la diffusibilité de la sucrase aux divers stades de la culture, j'ai répété l'expérience précédente avec des mycéliums d'âge différent. J'ai préparé le liquide fermentaire en m'adressant parallèlement à un mycélium jeune, encore à l'état de pellicule blanche, pris au moment où il hydrolyse le saccharose de la culture, et à un mycélium parvenu à la fin de son développement. On obtient, dans les deux cas, un macéré très actif sur le saccharose.

Ces faits jettent une certaine lumière sur les phénomènes qui accompagnent l'inversion du saccharose dans les cultures. Si, en effet, l'invertine apparaît en si petite quantité dans le liquide nutritif, au moment où s'effectue le dédoublement du saccharose, la raison n'en doit pas être cherchée dans la pauvreté en sucrase du mycélium jeune, puisque ce mycélium est capable de donner des liquides fermentaires très actifs, mais bien plutôt dans les obstacles qu'opposent les membranes de ce mycélium au passage du ferment. Ce n'est là, du reste, qu'une vérification de plus d'une donnée devenue classique depuis les travaux de Fernbach sur le *Sterigmatocystis nigra*.

Ainsi que l'a montré Holderer, on augmente beaucoup la teneur en sucrase du liquide fermentaire en alcalinisant l'eau de macération. Dans ses recherches relatives à la filtration des diastases, l'auteur, admettant la nature colloïdale des ferments et s'appuyant sur ce fait d'expérience que la grosseur

des micelles d'un colloïde est fonction de la réaction du milieu, a établi, pour diverses solutions diastasiques, que leur activité, après filtration à travers une bougie Chamberland, n'est pas diminuée si la solution est neutre à la phthaléine, tandis qu'elle subit un affaiblissement considérable en solution neutre au méthylorange.

Si l'on applique ces résultats à l'extraction des diastases, étant donné un mycélium mis à macérer dans de l'eau distillée, les ferments doivent passer plus facilement au travers des parois cellulaires si le liquide de macération est rendu alcalin. C'est, de fait, ce que constate Holderer sur les diastases du liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra* (1).

Bourquelot (2), donnant la technique des liquides fermentaires, avait signalé depuis longtemps ce fait, que la première eau de macération jouit d'une activité restreinte, tandis que la seconde est, au contraire, très active ; il insinue que l'acidité de la première macération, due au liquide de culture qui reste, après décantation, adhérent au mycélium et aux parois du matras, pourrait bien donner la raison de cette faible diffusion des ferments dans la première eau de macération.

J'ai répété, sur l'invertine du liquide fermentaire de *Botrytis*, les expériences de Holderer. On prépare trois macérations ainsi composées :

I	{	Mycélium frais.....	15 gr.	II	{	Mycélium frais.....	15 gr.
		HCl $\frac{n}{10}$	40 cc.			PO ⁴ Na ³ à 5 p. 100....	5 cc.
		H ² O.....	30 —			H ² O.....	35 —
III	{	Mycélium frais.....	15 gr.				
		H ² O.....	40 cc.				

Après un séjour de 24 heures à l'étuve à 26°, on filtre les liquides de macération, on sature de la façon convenable et on amène les trois solutions exactement au même volume. On dispose alors trois séries de matras jaugés à 10 centimètres cubes en introduisant dans chacun 8 centimètres cubes de macéré et 2 centimètres cubes d'une solution de saccharose. Cette solution renferme, pour 100 centimètres cubes, 20 grammes

(1) Holderer. *C. R.*, CXLIX, p. 1153, décembre 1909; *C. R.*, p. 285, janvier 1910; *C. R.*, p. 790, mars 1910.

(2) Bourquelot. *Bull. Soc. Myc.*, t. IX, 1893.

de saccharose, 2 grammes d'acide acétique cristallisable et des traces d'acétate de soude destinées à remplacer par de l'acide acétique les traces éventuelles d'acide chlorhydrique. On place les matras à l'étuve à 36° durant une heure, on arrête ensuite l'hydrolyse par l'addition d'une goutte de soude, puis on dose immédiatement le liquide total des matras. On trouve pour le cuivre réduit :

Macération alcaline.....	44 mg.
— neutre.....	29 —
— acide.....	26 —

Le macéré obtenu en milieu alcalin est donc, toutes choses égales d'ailleurs, sensiblement plus actif que les deux autres obtenus en milieu neutre et en milieu acide.

2° *Extrait mycélien*. — L'invertine du *Botrytis* s'obtenant avec la plus grande facilité par la méthode des liquides fermentaires, il était inutile de recourir au procédé plus compliqué des extraits mycéliens. Je me suis borné à constater que l'extrait obtenu après broyage se montre très actif vis-à-vis du saccharose, sans essayer d'établir de comparaison entre l'efficacité de l'extrait et celle du liquide fermentaire : les substances étrangères, albuminoïdes, hydrates de carbone, sels minéraux, dont est chargé l'extrait rendant cette comparaison impossible.

3° *Poudre fermentaire*. — La poudre fermentaire dédouble très rapidement le saccharose. Je n'ai eu recours au mycélium pulvérisé que dans un seul cas, pour comparer l'activité de la pellicule mycélienne à ses débuts et de la toile mycélienne âgée. Après avoir desséché et pulvérisé les mycéliums, j'ai fait agir, sur la même solution de saccharose, un même poids de mycélium jeune et de mycélium âgé. Les dosages établissent que le mycélium jeune est plus actif que le mycélium âgé et que par conséquent sa teneur en sucrase est supérieure à celle de la toile mycélienne vieillie. C'est encore un résultat classique et qui confirme, relativement à la diffusion de la sucrase aux diverses phases de la culture, les remarques que j'ai formulées précédemment.

MALTOSE

J'ai montré, au chapitre précédent, que l'étude des cultures ne fournit aucun renseignement sur l'existence, à l'intérieur des filaments de *Botrytis*, d'un ferment hydrolysant le maltose. C'est en pareil cas surtout qu'il est nécessaire de recourir aux divers procédés d'extraction actuellement en usage. Afin de rendre les résultats aussi comparables que possible, je me suis constamment servi, dans les expériences qui suivent, d'une solution de maltose renfermant, pour 100 centimètres cubes, 5 grammes de maltose pur à une molécule d'eau, 0^{sr},05 d'acide acétique cristallisable et des traces d'acétate de soude.

J'ai employé, comme antiseptique, le fluorure de sodium à 1 p. 100 ou le toluène.

1° *Liquide fermentaire*. — Le liquide fermentaire préparé avec le mycélium de *Botrytis* venu sur maltose se montre complètement dépourvu d'activité vis-à-vis du maltose.

Pour l'établir, on prépare les mélanges suivants :

I	{ Liquide fermentaire non bouilli.....	40 cc.
	{ Solution de maltose.....	—
II	{ Liquide fermentaire bouilli.....	40 cc.
	{ Solution de maltose.....	—

On abandonne les matras à l'étuve à 36-37° durant 5 jours, après quoi on effectue les dosages ; voici les résultats :

I.	Cuivre réduit.....	54 mg.
II.	—	55 —

Il n'y a donc eu aucune hydrolyse, ce qui prouve l'absence totale de maltase dans l'eau de macération. Par conséquent, l'expérience classique du liquide fermentaire est, elle aussi, impuissante à nous renseigner sur l'existence de la maltase à l'intérieur des filaments.

On se sert fréquemment, pour extraire certaines diastases, de solutions étendues de sel marin. On emploie même parfois des solutions salines concentrées, dans le but de dissoudre le moins possible de substances protéiques et d'obtenir ainsi un liquide diastasique plus pur.

J'ai fait usage d'une solution de NaCl à 10 p. 1000. Le mycélium, broyé avec de la ponce, a été mis à macérer dans cette solution, pendant 7 heures. Le liquide filtré, additionné de maltose et placé à l'étuve à 35° pendant 3 jours n'a produit aucune hydrolyse du maltose, ainsi que le prouvent les dosages suivants :

Matras non bouilli.....	55 mg. de cuivre par 1 cc.
Matras bouilli.....	52 — —

Il est difficile d'invoquer une action retardatrice de NaCl sur la maltase, Huerre (1) a montré, en effet, qu'à la dose de 1 p. 100, NaCl n'exerce pas d'action nuisible sur la maltase du Sarrasin.

L'insuccès est le même lorsqu'on remplace le chlorure par le fluorure de sodium. Le mycélium est resté pendant deux jours en contact avec une solution de NaF à 10 p. 1000. On obtient un liquide fermentaire légèrement coloré en jaune, actif vis-à-vis du saccharose et du raffinose, mais inefficace sur le maltose.

Je me suis adressé aussi à l'eau chloroformée comme liquide d'extraction. Le mycélium, grossièrement broyé, est mis à macérer à l'étuve à 26°, pendant 36 heures, dans l'eau distillée, saturée de chloroforme; après quoi on filtre. On prépare, comme à l'ordinaire, 2 séries de matras à hydrolysé; on laisse à l'étuve à 36° pendant 5 jours; après ce temps on dose sur 1 centimètre cube (2).

Matras bouilli.....	58 mg de cuivre.
Matras non bouilli.....	—

L'hydrolyse du maltose par l'extrait chloroformé est donc nulle après 5 jours de contact avec cet extrait.

Du reste, l'eau chloroformée paraît être, pour l'extraction de la maltase, un véhicule défectueux; Lintner et Kröber (3) ont montré, en effet, que la présence du chloroforme diminue no-

(1) Huerre. *Loc. cit.*, p. 114. Avant lui, Dubourg avait établi la même conclusion, relativement à la maltase de l'urine. On sait également, par les travaux de Bierry et Giaja, que le chlorure de sodium rend son activité au suc pancréatique devenu, par dialyse, incapable d'hydrolyser l'amidon et le maltose. Bierry et Giaja. *C. R.*, CXLIII, 1906, p. 302.

(2) Il faut avoir soin, dans ces opérations, d'éliminer complètement le chloroforme, ce dernier réduisant la liqueur de Fehling.

(3) Lintner et Kröber. *Berichte d. d. chem. Gesels.*, t. XXVIII, p. 1050, 1895.

tablement l'activité de la maltase de la Levure. Huerre (1) signale la même action retardatrice, moins accentuée cependant, du chloroforme sur la maltase du Sarrasin.

Je n'ai pas eu plus de succès avec l'extrait glycérimé. Pour préparer cet extrait, on met à macérer dans la glycérine le mycélium préalablement broyé, on étend d'eau, on filtre et on dispose les matras d'expérience comme à l'ordinaire. Après 3 jours, on dose sur 1 centimètre cube :

Matras non bouilli.....	58 mg. de cuivre.
— bouilli.....	55 —

Le maltose n'a donc subi à peu près aucun dédoublement.

J'ai dit, précédemment, que Holderer avait étendu à un grand nombre de diastases les résultats obtenus par lui, tout d'abord, avec l'invertine. J'espérais donc qu'en alcalinisant l'eau de macération je faciliterais la diffusion de la maltase au travers des membranes.

Dans ce but, j'ai entrepris les expériences qui suivent.

Le mycélium, grossièrement broyé, est mis à macérer pendant 3 heures à l'étuve à 27°, dans une solution de NaOH $\frac{n}{30}$; on filtre et on neutralise exactement avec HCl; on fait bouillir une partie du liquide pour détruire ses propriétés diastasiques et l'on prépare les mélanges suivants :

A	{ Liquide d'extraction bouilli.
	{ Solution de maltose.
B	{ Liquide d'extraction non bouilli.
	{ Solution de maltose.

Ces mélanges sont abandonnés pendant 6 jours à l'étuve à 36°; après quoi on effectue le dosage sur 1 centimètre cube.

A.....	46 mg. de cuivre.
B.....	45 —

J'ai répété l'expérience de différentes manières en augmentant ou diminuant le titre en soude du liquide d'extraction; en faisant varier le temps de macération; en m'adressant tantôt à des mycéliums jeunes, tantôt à des mycéliums âgés. Jamais je n'ai pu obtenir un liquide fermentaire actif sur le maltose.

(1) Huerre. *Loc. cit.*, p. 88.

Holderer s'est aperçu, au cours de ses expériences sur la filtration des diastases, que l'émulsine d'amandes douces filtre beaucoup mieux en milieu neutre au méthylorange qu'en milieu neutre à la phtaléine, et que la pepsine peut même filtrer en milieu franchement acide (2 p. 1000 de HCl).

Mettant à profit ces observations, j'ai tenté l'extraction de la maltase en employant, comme véhicule, l'eau distillée légèrement acidulée par l'acide acétique. Les liquides fermentaires obtenus par ce procédé se montrent impuissants à hydrolyser le maltose.

En présence de ces tentatives infructueuses d'extraction, il y avait lieu de vérifier l'action de divers facteurs, notamment, de la réaction et de la température, sur le dédoublement du maltose.

Pour ce qui est des maltases d'origine végétale, Effront (1) admet que leur action est maxima en milieu faiblement acide; la dose d'acidité ne doit pas dépasser 2 millièmes de SO^4H^2 .

Laborde (2), de son côté, a montré que l'addition ménagée d'acide acétique ou succinique active l'hydrolyse du maltose. Toutes différentes sont les conclusions de Huerre relatives aux maltases des différents Maïs : certaines espèces de Maïs fournissent une maltase dont le maximum d'activité s'exerce en milieu franchement alcalin; la maltase d'autres espèces, voisines cependant des premières, est plus efficace en réaction neutre ou légèrement acide.

En faisant varier la réaction du milieu par degrés insensibles, depuis l'alcalinité franche obtenue par deux gouttes de soude à 36° pour 10 centimètres cubes, jusqu'à réaction acide obtenue par 2 gouttes d'acide acétique cristallisable, on ne constate, pour les différentes doses d'acide ou d'alcali expérimentées, aucune hydrolyse du maltose sous l'action des liquides fermentaires de *Botrytis*.

Relativement à la température d'expérience, Laborde a fixé l'optimum de l'amylo-maltase à 60° pour le *Sterigmatocystis ni-*

(1) Effront. *Les Enzymes*, p. 225.

(2) Laborde. *Ann. Institut Pasteur*, janvier 1897, p. 33.

(3) Huerre. *Loc. cit.*, p. 58.

gra, à 45° pour le *Penicillium crustaceum*, à 50° pour l'*Eurotiosis Gayoni* (1). Morris donne 50-55° pour l'optimum de la maltase du Maïs, tandis que Geduld trouve 57-60°. Huerre a établi que l'optimum de la maltase du Maïs varie avec les différentes espèces : certains Maïs possédant des maltases basses dont l'optimum est situé vers 40° et qui agissent encore à 0°, d'autres possédant des maltases hautes qui n'agissent qu'à partir de 20° et dont l'optimum est placé vers 60° (2).

Afin de vérifier que la température de 35°, à laquelle j'opérais, n'était pas responsable des insuccès précédents, j'ai expérimenté diverses températures, réparties entre 30 et 55°. Pour toutes ces températures, les liquides fermentaires de *Botrytis* sont constamment restés inactifs à l'égard du maltose,

L'échec de mes tentatives d'extraction n'était donc pas attribuable à la technique adoptée pour caractériser la maltase dans les liquides fermentaires.

2° *Extraits mycéliens*. — Tous ces insuccès pouvaient tenir aux difficultés insurmontables que rencontrerait la maltase dans le passage à travers la membrane des filaments. Il y aurait là quelque chose d'analogue à ce qui se passe pour la sucrase du *Monilia candida*. Il ne faut pas exagérer cette résistance opposée par la membrane; en effet, lorsque les mycéliums sont âgés, une grande quantité de matières albuminoïdes ou gommeuses se répandent dans le liquide de macération, et ces substances rendent le liquide d'autant plus visqueux que la culture est plus âgée.

Toutefois, pour dissiper ce doute, j'ai pratiqué les extractions précédentes sur des mycéliums préalablement broyés au mortier avec de la poudre de verre, de la poudre d'émeri, de la pierre ponce, du tripoli, etc...

Il est vrai que ce procédé ne réussit pas à ouvrir toutes les cellules; on se rend compte cependant, à l'examen microscopique, qu'un grand nombre de cellules sont endommagées; du reste, H. Will (3), qui a fait l'observation sur la Levure, a constaté qu'après un broyage énergique 31 p. 100 seulement

(1) Laborde. *Loc. cit.*, p. 79.

(2) Huerre. *Loc. cit.*, p. 33.

(3) H. Will, cité par Duclaux. *Microbiologie*, t. II, p. 554.

des cellules de Levure demeurent intactes, et pourtant ces cellules présentent un diamètre très petit et une élasticité qui n'appartient pas aux filaments mycéliens.

Quoi qu'il en soit, en répétant sur ces bouillies mycéliennes les mêmes tentatives d'extraction que précédemment dans la préparation des liquides fermentaires, je n'ai pas obtenu de liquide franchement actif sur le maltose. Parfois les dosages après inversion donnent pour le cuivre un chiffre supérieur de quelques milligrammes au chiffre trouvé avant inversion, mais dans aucun cas, si longtemps que l'expérience ait été prolongée, je n'ai vu l'extrait mycélien déterminer l'hydrolyse totale du maltose.

3° *Poudre fermentaire.* — L'absence de glucose dans le liquide des cultures sur maltose, l'inactivité de ce liquide de culture vis-à-vis du maltose, l'impossibilité d'obtenir, par les procédés ordinaires d'extraction, une macération capable d'hydrolyser le maltose, sembleraient, à s'en tenir à la notion courante des ferments solubles, mettre en doute, dans le cas du *Botrytis cinerea*, l'hydrolyse du maltose préalable à son assimilation, fait établi par Bourquelot (1) dès 1886, tant pour le liquide intestinal que pour le *Sterigmatocystis nigra* et le *Penicillium crustaceum*.

Cependant, il existe à l'intérieur des filaments de *Botrytis* un principe susceptible d'hydrolyser le maltose. En effet, si l'on recueille le mycélium, qu'on le dessèche, qu'on le pulvérise et qu'on le mette en présence d'une solution de maltose antiseptisée par le toluène ou NaF, le sucre est à peu près complètement hydrolysé après 2 jours à l'étuve à 35°.

Je donne le détail de l'une de ces expériences. On prépare les trois mélanges suivants :

- | | | | |
|-------|----------------------|------|---|
| I { | Poudre mycélienne. | II { | Poudre mycélienne passée à l'autoclave. |
| | Solution de maltose. | | Solution de maltose. |
| III { | Poudre mycélienne. | | |
| | Eau distillée. | | |

Après deux jours de contact, à l'étuve à 36°, on effectue sur un centimètre cube les dosages avant et après inversion; on trouve :

(1) Bourquelot. Recherches sur les propriétés physiologiques du maltose. *Journ. de l'Anatomie et de la Physiologie*, 1886, p. 189.

I	{ Avant inversion.....	95 mg. de cuivre.	
	{ Après —	100 — —	
II	{ Avant —	56 — —	
	{ Après —	100 — —	
III	{ Avant —	traces —	
	{ Après —	traces —	

L'hydrolyse est donc pratiquement complète dans les matras de la série I.

Les mycéliums donnent cette réaction à toutes les époques de la végétation; je l'ai obtenue aussi bien avec la pellicule blanche recueillie au début des cultures qu'avec des toiles mycéliennes âgées de plusieurs semaines.

C'est bien à la présence d'une diastase que la poudre mycélienne doit la propriété d'hydrolyser le maltose. En effet, si l'on fait subir au mycélium un traitement préalable à l'autoclave à 130° durant une heure, il devient incapable d'opérer le moindre dédoublement. De plus, en faisant agir sur le maltose une poudre ayant servi déjà pour une première hydrolyse, on observe un nouveau dédoublement, ce dernier toutefois, moins accentué que le premier. Enfin, on ne peut alléguer une solubilité de la maltase dans l'eau, à la température de 36° où l'on opère, car le liquide filtré, mis en présence d'une solution de maltose, est complètement incapable de l'hydrolyser.

Il nous est possible, désormais, de résoudre le problème de l'assimilation directe ou indirecte du maltose par le *Botrytis cinerea*. Puisqu'il existe, dans le mycélium, un principe actif vis-à-vis du maltose, ce ferment doit exercer son pouvoir hydrolysant au cours du développement de la moisissure; grâce à cette diastase, le maltose qui a pénétré dans les cellules s'y transforme en deux molécules de glucose directement assimilé par l'organisme. La question se trouve ainsi jugée dans le même sens que Bourquelot l'a résolue, il y a plus de vingt ans, pour le *Sterigmatocystis nigra*.

Pourquoi le glucose, mis en liberté à l'intérieur des cellules, ne se répand-il pas dans le liquide de culture?

C'est évidemment qu'il n'est produit qu'à très petites doses qui disparaissent, au fur et à mesure, utilisées par la moisissure. Mais cette production très restreinte de glucose ne peut tenir qu'à la faible activité de la maltase différenciée par les

cellules. J'ai pu me rendre compte qu'en effet la maltase est très peu abondante dans le mycélium si l'on prend comme terme de comparaison la teneur en invertine de ce même mycélium. On prend 500 milligrammes de poudre mycélienne, on les met en présence d'une solution renfermant 250 milligrammes de maltose; en deux ou trois jours, l'hydrolyse est complète. On recueille la poudre fermentaire et, après lavage à l'eau distillée, on la fait agir sur une nouvelle solution de maltose; cette seconde hydrolyse est déjà beaucoup plus lente; une troisième tentative reste complètement infructueuse. Au contraire, en opérant dans les mêmes conditions sur le saccharose, on dédouble rapidement une quantité de sucre bien supérieure au poids du mycélium employé. L'expérience qui suit n'est pas moins significative. Je prépare deux matras de culture renfermant, pour 250 centimètres cubes de liquide, l'un 12^{gr},5 de saccharose, l'autre 12^{gr},5 de maltose. J'introduis dans le matras à maltose le mycélium jeune, préalablement desséché et pulvérisé, provenant d'une culture antérieure sur maltose, et parallèlement, dans le matras à saccharose, un même poids d'une poudre fermentaire préparée à partir d'un mycélium jeune venu sur saccharose. L'hydrolyse est bientôt terminée dans le matras à saccharose, elle est lente et incomplète dans le matras à maltose.

On peut donc affirmer que, par rapport à l'invertine, la maltase est produite, dans les cellules, en très petite quantité.

C'est là peut-être que réside la cause des insuccès qui signalent les tentatives d'extraction de la maltase. On pourrait alléguer aussi que la maltase est tellement fragile que les traitements infligés au mycélium, au cours de l'extraction, suffisent à l'altérer. Il est possible également de soutenir que la difficulté d'obtenir la maltase en solution tient principalement à l'adhérence très forte du ferment à la pulpe mycélienne : la maltase du *Botrytis* serait à rapprocher de ces ferments non diffusibles que certains auteurs ont qualifiés plus ou moins heureusement d'*insolubles*.

Cette notion de diastase insoluble n'est d'ailleurs pas nouvelle ainsi que le remarque Huerre (1); on connaît depuis longtemps

(1) Huerre. *Loc. cit.*, p. 140.

des exemples de ferments non diffusibles. Mais jusqu'à présent ces résultats qui pourraient bien modifier, par certains côtés, nos vues actuelles sur les diastases, n'ont peut-être pas reçu toute la considération qu'ils méritent : nous sommes habitués, en effet, à admettre qu'une diastase est, par définition, un ferment parfaitement soluble et diffusible, du type de l'invertine de Levure ou d'Aspergille.

Lorsqu'on parle de ferment insoluble, on fait totalement abstraction de l'imperméabilité des parois cellulaires ; une diastase qui ne sort pas des cellules qui la contiennent ne peut être dite insoluble si un simple broyage suffit à la mettre en liberté. Ainsi, par exemple, la sucrase du *Monilia candida* ne doit pas être comptée parmi les ferments insolubles puisqu'elle entre en solution après écrasement des cellules.

Il faut réserver, ainsi que l'a fait Huerre, le nom de diastases insolubles aux ferments n'entrant pas en solution mais susceptibles de transformer les corps spécifiques qui, à l'état dissous, sont ajoutés à la poudre fermentaire.

Les grains de Kéfyra, par exemple, ne cèdent à l'eau de macération que la sucrase sans trace de lactase ; desséchés et pulvérisés, ils sont capables d'hydrolyser le lactosé (1).

L'émulsine de *Lichens* (2), l'émulsine de *Polyporus sulfureus* (3), refusent également d'entrer en solution et restent énergiquement fixées à la pulpe. Le cas du *Polyporus sulfureus* est particulièrement intéressant : à l'état frais, le champignon abandonne facilement son émulsine au liquide de macération ; lorsque la pulpe se dessèche, le ferment adhère aux tissus au point de ne pouvoir plus en être détaché.

La géase des racines de *Geum urbanum* (4), la tréhalase de *Russula Queletii* (5), sont pareillement insolubles.

Le Sarrasin renferme, comme l'a établi Huerre (6), une maltase insoluble. Si l'on suit, en effet, les variations de la maltase au cours de la germination, on constate que les macérés

(1) Duclaux. *Microbiologie*, t. II, p. 527.

(2) Hérissé. *Jour. de Pharm. et de Chimie*, t. VII, p. 577, 1898.

(3) Hérissé. *Thèse de Pharmacie*, Paris 1899, p. 73.

(4) Bourquelot. *Jour. de Pharm. et de Chimie*, t. XXI, p. 490, 1905.

(5) Bourquelot. *Jour. de Pharm. et de Chimie*, t. XXI, p. 505, 1905.

(6) Huerre. *Loc. cit.*, p. 137.

d'abord très actifs sur le maltose perdent peu à peu leur efficacité ; à partir du cinquième jour, ils deviennent totalement incapables d'hydrolyser le maltose mais la pulpe garde ce pouvoir. L'interprétation de ces faits est immédiate, les fruits de Sarrasin qui, dans les premiers jours de la germination, contenaient de la maltase soluble, ne possèdent plus, à partir du cinquième jour, que de la maltase insoluble et cette dernière ne provient pas exclusivement de l'insolubilisation de la maltase soluble, elle existe en effet, dans le fruit, dès avant germination.

On a même réussi, dans certains cas, à pénétrer le mécanisme de l'insolubilisation des ferments. Si l'on additionne de 1 gramme de tanin, comme l'a fait Hérissé, 30 centimètres cubes d'une solution d'émulsine à 0 gr. 25 p. 100, il se produit un précipité volumineux ; ce précipité garde la propriété d'hydrolyser l'amygdaline ; la liqueur filtrée, au contraire, est totalement inactive. Le tanin a donc insolubilisé l'émulsine.

De même, Brown et Morris ont montré, après Jenty, que lorsque les feuilles contiennent du tanin, ce dernier empêche la dissolution de l'amylase contenue dans les feuilles (1).

En tenant compte de ce que l'on sait actuellement sur la zymase alcoolique, il y aurait lieu de se demander, au sujet des diastases insolubles, si de très fortes pressions n'auraient pas pour résultat d'exprimer des cellules les enzymes qui se refusent à passer dans les liquides de macération.

Les auteurs n'ont généralement pas entrepris cette vérification et se bornent à comprendre, sous l'appellation de diastases insolubles, les ferments qui n'entrent pas en dissolution dans les conditions *ordinaires* d'épuisement des substances végétales, sans faire intervenir une pression supérieure à la pression normale.

Le résultat le plus intéressant qui ressort de ces études est la mise en évidence de deux catégories de diastases : les unes, facilement diffusibles, du type de l'invertine de Levure, les autres, fortement adhérentes aux contenus cellulaires, du type de l'émulsine de Lichens ou de la maltase de Sarrasin.

En réalisant artificiellement des conditions qui se rapprochent

(1) Duclaux. *Microbiologie*, t. II, p. 70.

suffisamment des conditions naturelles, Victor Henri (1) a pu établir, relativement aux diastases endocellulaires, les deux conclusions suivantes :

1° La température influe beaucoup moins sur la vitesse d'inversion lorsque le ferment n'est pas diffusible que dans le cas où il se répand dans le liquide.

2° Avec les enzymes endocellulaires, la vitesse d'inversion est proportionnelle à la concentration, pour des concentrations qui, d'ordinaire, sont sans influence sur cette vitesse d'inversion.

J'ai vérifié ces deux conclusions sur la poudre fermentaire de *Botrytis*.

1° Les températures étaient respectivement 31°, 38°, 52°. Les matras dans lesquels on suivait l'hydrolyse renfermaient chacun 400 milligrammes de poudre fermentaire, 5 centimètres cubes de la solution de maltose, et 5 centimètres cubes d'eau antiseptisée par le toluène. Après 40 heures, on dosait sur 2 centimètres cubes :

Matras à 30°.....	87 mg. de cuivre
— à 38°.....	87 — —
— à 52°.....	80 — —

Pendant le même temps, les matras à poudre fermentaire préalablement passée à l'autoclave n'offrent pas trace d'hydrolyse ; au contraire, le dédoublement du maltose n'est pas loin d'être total dans les matras à poudre fermentaire active.

On voit par les chiffres qui précèdent qu'une différence de 22°, dans la température, n'a déterminé qu'une variation très faible dans l'activité de la poudre fermentaire. Huerre a obtenu des résultats analogues en opérant sur la maltase insoluble du Sarrasin.

2° En ce qui concerne l'influence de la concentration sur la vitesse d'hydrolyse, Mlle Philoche a établi que, pour des solutions de maltose variant de 2 à 8 p. 100, les quantités absolues de maltose hydrolysé au bout d'un certain temps, par une même quantité de diastase, sont sensiblement identiques (2). Cette loi ne se vérifie pas lorsqu'on prend comme source de

(1) Victor Henri. *C. R.*, CXLII, p. 97, janvier 1906.

(2) Mlle Philoche. *Thèse de doctorat ès sciences*, Paris, 1908, p. 29.

maltase le mycélium de *Botrytis* : les quantités absolues de glucose formé après le même temps augmentent, dans ce cas, avec la concentration. Voici le détail de l'expérience :

Dans les matras à hydrolyse, j'introduis le même poids de mycélium haché en menus morceaux ; cette poudre grossière avait été lessivée sur filtre Büchner afin de la débarrasser, autant que possible, des substances réductrices provenant du liquide de culture ; elle hydrolysait d'ailleurs, lentement comme à l'ordinaire, le maltose. Le sucre était présent dans les matras aux doses suivantes :

I.....	Maltose 2,4 p. 100
II.....	— 3,3 —
III.....	— 6,6 —

L'antiseptique était le toluène à 1 p. 100, la température d'expérience 37°. Après 30 heures, on effectue les dosages.

Les quantités absolues de maltose anhydre hydrolysé dans chaque matras sont, pour 2 centimètres cubes :

I.....	33 mg. sur 45
II.....	44 — — 62
III.....	68 — — 120

Entre 2 et 6 p. 100, la vitesse d'hydrolyse du maltose par la poudre fermentaire augmente donc avec la concentration.

A la suite de ces recherches sur l'invertine et la maltase, il est plus facile de comprendre le mode d'utilisation si différent du saccharose et du maltose par le *Botrytis cinerea*. Entre la sucrase et la maltase de cette moisissure, il existe deux divergences essentielles :

1° L'invertine diffuse avec la plus grande facilité ; la maltase est un enzyme strictement endocellulaire.

2° La sucrase est sécrétée en abondance, tandis que les doses de maltase présentes dans le mycélium restent toujours très faibles.

En raison de la richesse du mycélium en invertine et de la diffusibilité de ce ferment, le saccharose subit, dans les cultures, une hydrolyse rapide et le milieu nutritif s'enrichit progressivement en sucre interverti. Les propriétés inverses de la maltase entraînent, comme conséquence, l'hydrolyse lente du

maltose et l'absence des produits d'inversion à l'intérieur du liquide de culture.

L'invertine et la maltase du *Botrytis* représentent donc deux types de ferments entièrement irréductibles dont les propriétés déterminent l'aspect différent des cultures sur saccharose et sur maltose. Peut-être sera-t-il possible de rapprocher, avec plus ou moins de rigueur, de l'un ou l'autre de ces deux types, les diastases dont l'étude suit.

RAFFINOSE

Les cultures sur raffinose nous ont appris qu'au début du développement de la moisissure ce sucre subit rapidement l'hydrolyse faible, caractérisée par l'apparition, dans le milieu nutritif, d'un mélange de lévulose et de mélibiose. Dans la suite, le lévulose disparaît plus rapidement que le mélibiose, et ce dernier, resté à peu près seul, est utilisé à la façon du maltose, c'est-à-dire que les produits de l'hydrolyse sont toujours absents du liquide de culture.

Ces résultats suggèrent l'idée que deux ferments distincts interviennent au cours d'une culture sur raffinose : l'un, analogue à l'invertine, l'autre se rapprochant de la maltase.

L'étude des propriétés actives du liquide de culture donne raison, en partie, à cette conclusion ; la raffino-lévulase, comme l'invertine, diffuse, en effet, dans le milieu nutritif, tandis que la mélibiose, se rapprochant en cela de la maltase, y fait constamment défaut.

Seule, l'étude comparée du liquide fermentaire, de l'extrait mycélien et de la poudre fermentaire peut résoudre avec rigueur le problème de ces analogies. Si la raffino-lévulase est un ferment voisin de l'invertine, à plus forte raison si elle lui est identique, elle passera avec autant de facilité que l'invertine dans le liquide fermentaire. De même, on ne pourra rapprocher la mélibiose de la maltase que si le liquide fermentaire et l'extrait mycélien se montrent sans action sur le mélibiose, la poudre fermentaire étant seule capable de déterminer l'hydrolyse complète du raffinose.

On a essayé déjà sur le raffinose l'action d'un grand nombre de liquides organiques. Bourquelot (1), tout d'abord, s'est adressé au liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra*. Mettant en présence 25 centimètres cubes de solution de raffinose à 2 p. 100 et 25 centimètres cubes de liquide fermentaire, il constatait qu'après sept jours, le pouvoir rotatoire passait de $+103^{\circ}12'$ à $+50^{\circ}$, c'est-à-dire que l'hydrolyse était poussée un peu plus loin que le stade inversion faible. L'action, remarque l'auteur, est très lente, surtout à la fin, « sans doute en raison de la quantité très faible de ferment soluble ». Fischer a montré que l'émulsine d'amandes achève l'hydrolyse du raffinose commencée par la levure haute.

Le liquide fermentaire de *Penicillium crustaceum* agit très lentement sur le raffinose : si l'on se reporte aux expériences de Gillot, le pouvoir rotatoire d'une solution de raffinose dans le liquide fermentaire serait tombé, après vingt-six jours, de $+104^{\circ}$ à $+73^{\circ}$; le stade inversion faible est donc très loin d'être atteint, puisque ce stade est caractérisé par un pouvoir rotatoire égal à $+53^{\circ}$.

Au contraire, dans les cultures de *Penicillium* sur raffinose, d'après le même auteur, l'hydrolyse est à peu près terminée dès le second jour. Les résultats obtenus dans les cultures sont donc très différents de ceux auxquels on arrive par l'étude du liquide fermentaire. Il semblerait pourtant que plus l'hydrolyse d'une substance est rapide dans les cultures, plus abondante est la diastase qui détermine cette hydrolyse.

Il est vrai que l'action du liquide fermentaire sur le raffinose a été suivie au polarimètre, tandis que les transformations du sucre au cours des cultures étaient observées au moyen des dosages à la liqueur cupropotassique, avant et après traitement par HCl étendu ; vraisemblablement, comme je l'ai montré, l'auteur ne prolongeait pas l'action de l'acide au delà du stade inversion faible du raffinose.

On s'est adressé également à des macérations d'origine animale ; les résultats ont été généralement négatifs ; ainsi en a-t-il été des essais de Pautz et Vogel (2) avec l'intestin

(1) Bourquelot : Sur l'hydrolyse du raffinose par les ferments solubles. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 3. [6], p. 390, 1896.

(2) Pautz et Vogel. *Zeitschr. für Biologie*, XXXII, p. 304, 1895.

grêle de chien, de Fischer et Niebel (1) avec la muqueuse intestinale du cheval et d'un grand nombre d'autres animaux.

Cependant Strauss (2), en 1909, a signalé le dédoublement du raffinose par des extraits d'insectes. Enfin, plus récemment encore, Giaja (3) a fait l'étude détaillée des ferments du raffinose chez les Mollusques et les Crustacés ; d'après cet auteur, le suc digestif d'*Arion*, de même que celui d'*Helix* et celui d'*Astacus*, dédoublent le raffinose ; cette hydrolyse est rapide jusqu'au stade lévulose-mélibiose, après quoi le mélibiose est probablement attaqué à son tour, mais plus lentement ; au contraire, les Mollusques marins (*Aplysia*) et les Crustacés marins ne possèdent pas de ferment actif sur le raffinose.

Je vais étudier successivement l'action, sur le raffinose, du liquide fermentaire, de l'extrait mycélien et de la poudre fermentaire de *Botrytis cinerea*.

1° *Liquide fermentaire*. — Ce liquide se révèle très actif sur le raffinose aussi bien que sur le saccharose ; mais l'hydrolyse du raffinose s'arrête constamment au stade inversion faible. Le liquide fermentaire, comme le liquide de culture, ne renferme pas de mélibiose. Il était donc nécessaire, pour essayer de mettre en évidence ce ferment, de recourir à l'étude des extraits mycéliens.

2° *Extrait mycélien*. — Le mycélium de plusieurs cultures arrivées à la fin de leur développement est mis à digérer, après broyage au mortier, dans l'eau distillée, on filtre, on fait bouillir une partie du liquide ; on prépare alors deux matras renfermant chacun 2 grammes de raffinose et 50 centimètres cubes de macéré bouilli ou non. On place à l'étuve à 36-37° et on effectue, par intervalle, les dosages sur 2 centimètres cubes. Deux matras témoins, ne renfermant que les extraits additionnés d'eau distillée, serviront à observer les transformations éventuelles des extraits durant le séjour à l'étuve.

Voici les résultats obtenus :

(1) Fischer et Niebel. Ueber das Verhalten der Polysaccharide gegen einige thierische secrete und Organe. *Sitzungsber. d. kön. preuss. Ak. d. Wiss. zu Berlin*, V, p. 73, janvier 1896.

(2) Strauss. Ueber das Vorkommen einiger Kohlenhydratefermente bei Lepidopteren und Dipteren. *Zeitschr. f. Biol.*, p. 52, 1909.

(3) Giaja. *Loc. cit.* p. 182.

Intervalle des dosages :	Cuivre réduit par 2 cc.	
	Matras non bouilli :	Matras bouilli :
Dosage initial.....	46 mg.	45 mg.
Après 1 jour 1/2.....	106 —	
Après 2 jours.....	128 —	
— 3 —	133 —	
— 5 —	136 —	
— 10 —	141 —	
— 12 —	142 —	
— 17 —	142 —	46 —

Les matras témoins indiquent que les extraits ne subissent, au cours de l'expérience, aucune transformation de nature à augmenter leur pouvoir réducteur ; le dosage, pratiqué sur 2 centimètres cubes, donne 45 milligrammes de cuivre au début de l'expérience et 46 milligrammes à la fin.

Il est facile de se rendre compte du stade atteint par l'hydrolyse. Si, en effet, l'inversion subie était l'inversion forte, 2 centimètres cubes du liquide des matras renfermeraient, étant donné qu'on a introduit 2 grammes d'hydrate de raffinose, 24^{mg}, 2 de lévulose, autant de glucose et autant de galactose ; ce mélange réduirait, d'après les tables de Bertrand, 138 milligrammes de cuivre ; or, l'expérience ne donne que 142 — 46 = 96 milligrammes de cuivre. Si, au contraire, l'action de la diastase s'est arrêtée à l'inversion faible, le mélange doit contenir, indépendamment des substances réductrices présentes dans l'extrait mycélien, 24^{mg}, 2 de lévulose et 46 milligrammes de mélibiose, mélange qui réduit 97 milligrammes de cuivre.

Et de fait, si l'on soumet à l'inversion totale 2 centimètres cubes du liquide d'expérience, lorsque son pouvoir réducteur est devenu stable, on trouve 185 milligrammes de cuivre au lieu de 142.

Du reste, le traitement à l'acétate de phénylhydrazine, pratiqué à la fin de l'expérience, donne très nettement une osazone insoluble à chaud, présentant les caractères microscopiques de la glucosazone, fondant comme elle vers 230°, et, dans la liqueur filtrée, il se dépose, par refroidissement, une seconde osazone, intégralement soluble à chaud et fondant au bloc Maquenne vers 180° ; c'est donc l'osazone du mélibiose.

D'autres expériences m'ont fourni des résultats semblables ;

je les cite à titre documentaire, ces nombres pouvant à l'occasion rendre quelques services dans des recherches d'ordre plus général sur les lois d'action des diastases.

Intervalle des dosages :

Cuivre réduit par cc.
Matras non bouilli; Matras bouilli :

EXPÉRIENCE I

Dosage initial.....	22 mg.	22 mg.
Après 15 heures.....	196 —	
— 24 —	105 —	
— 2 jours.....	113 —	
— 4 —	121 —	
— 10 —	125 —	
— 15 —	125 —	23 —

EXPÉRIENCE II

Dosage initial.....	22 mg.	22 —
Après 15 heures.....	89 —	
— 2 jours.....	116 —	
— 4 —	119 —	
— 10 —	123 —	
— 15 —	123 —	22 —

Les deux expériences ont été effectuées à la température de 27°.

J'ai voulu donner à ces recherches toute la certitude désirable en contrôlant, par la méthode polarimétrique, les résultats obtenus au moyen des dosages à la liqueur cupropotasique.

Je dispose, à cet effet, une série de 6 matras jaugés à 25 centimètres cubes, renfermant chacun 10 centimètres cubes d'une solution de raffinose à 10 grammes p. 100 et 15 centimètres cubes d'extrait mycélien. Aussitôt le premier matras préparé, on procède à l'examen polarimétrique; les autres matras sont placés à l'étuve à 26° et étudiés en temps convenable. Le tableau ci-dessous donne les variations du pouvoir rotatoire au cours de l'action de l'extrait mycélien sur le raffinose :

Intervalle des dosages :

Pouvoirs rotatoires.

Dosage initial.....	+ 108°
Après 24 heures.....	+ 70°
— 38 —	+ 68°
— 5 jours.....	+ 59°
— 10 —	+ 58°
— 15 —	+ 58°

Le pouvoir rotatoire trouvé à partir du cinquième jour cor-

respond à l'inversion faible du raffinose. En effet, l'extrait mycélien est réducteur et dévie, pour sa part, le plan de polarisation. Son action propre est indiquée par l'examen successif de 2 mélanges : le premier est une solution de 1 gramme de raffinose dans 25 centimètres cubes d'eau distillée, il a comme pouvoir rotatoire $+ 104^{\circ}$; le deuxième est une solution de 1 gramme de raffinose dans 10 centimètres cubes d'eau distillée additionnés de 15 centimètres cubes d'extrait mycélien, il a comme pouvoir rotatoire $+ 108^{\circ}$. C'est donc 4 degrés qu'il faut retrancher de chacun des nombres du tableau précédent pour obtenir le pouvoir rotatoire relatif au raffinose ou à ses produits d'hydrolyse. On a de la sorte, à la fin de l'expérience, $+ 54^{\circ}$ pour le pouvoir rotatoire définitif, ce qui correspond bien à l'inversion faible. Du reste, des matras témoins, dont l'extrait avait été préalablement soumis à l'ébullition durant un quart d'heure, ont conservé, pendant toute l'expérience, le même pouvoir rotatoire égal à $+ 108^{\circ}$; ce qui montre que les substances actives, propres au macéré, n'ont pas évolué à l'étuve.

Pour prendre les pouvoirs rotatoires, j'ai opéré de la façon suivante. Le liquide des matras est étendu de 10 centimètres cubes d'eau distillée et traité par 1 centimètre cube de nitrate mercurique, suivant la méthode de défécation préconisée par Tanret ; après un contact de cinq minutes, on neutralise par 1 centimètre cube de soude de titre convenable, on porte ensuite le volume à 40 centimètres cubes. On filtre et on passe au polarimètre. Le sucre se trouvant entraîné par le précipité dans la proportion même où il existe dans le liquide, le pouvoir rotatoire était donné, dans tous les cas, par la formule :

$$[\alpha] = \frac{\alpha \cdot 40}{2.1}$$

Ces recherches sur le liquide fermentaire et sur l'extrait mycélien établissent que, dans les expériences *in vitro*, aussi bien que dans les cultures, la molécule de lévulose se détache du raffinose avec la plus grande facilité. C'est exactement ce qui se passe avec le saccharose.

L'hydrolyse faible du raffinose par le *Botrytis* est donc à

rapprocher de l'inversion du saccharose par le même organisme. En d'autres termes, le *Botrytis cinerea* élabore, au cours de l'assimilation du raffinose, une raffino-lévulase, qui, si elle n'est pas l'invertine elle-même, appartient à la même famille de ferments.

Au contraire, nous n'avons, jusqu'à présent, caractérisé aucune diastase qui fût susceptible de dédoubler le mélibiose. Il existe donc, à ce point de vue, un parallélisme remarquable entre le mélibiose et le maltose. Cette ressemblance entre le mode d'assimilation des deux sucres serait complète si le mycélium venu sur mélibiose se montrait capable, à l'état de poudre fermentaire, d'effectuer le dédoublement du mélibiose, alors que ni le liquide de culture, ni le liquide fermentaire, ni l'extrait mycélien ne sont doués de cette propriété.

3° *Poudre fermentaire.* — J'ai mis en évidence les propriétés diastasiques de la poudre mycélienne, en opérant comme il suit : le mycélium sec, pulvérisé, est introduit dans un matras de 50 centimètres cubes ; on remplit jusqu'au trait de jauge avec une solution d'hydrate de raffinose à 4 grammes pour 100 centimètres cubes, rendue stérile par le fluorure de sodium. On prépare par ailleurs deux matras témoins dont l'un ne diffère du précédent que par le traitement à l'autoclave infligé préalablement à la poudre fermentaire ; le second témoin ne renferme que la poudre en suspension dans l'eau. Les trois matras sont placés en même temps à l'étuve à 37° ; par intervalle, on effectue les dosages sur 1 centimètre cube. Voici les résultats :

Intervalle des dosages :	Cuivre par 1 cc.
Dosage initial.....	14 mg.
Après 1 jour.....	50 —
— 2 —	62 —
— 4 —	71 —
— 6 —	76 —
— 8 —	78 —

A la fin de l'expérience, les deux témoins réduisent 15 milligrammes de cuivre par centimètre cube, ce qui prouve que la poudre mycélienne, préalablement chauffée, a perdu toutes ses propriétés actives et que les substances contenues dans la poudre ne subissent, au cours de l'expérience, aucune modification qui augmente leur pouvoir réducteur.

Il est facile de se rendre compte de la marche de l'hydrolyse : très rapide au début, elle se ralentit dès le deuxième jour, sans cesser du reste de progresser. Ce ralentissement, observé déjà par Bourquelot opérant avec le liquide fermentaire de *Sterigmatocystis nigra*, tient à deux causes : tout d'abord, la vitesse de dédoublement du raffinose diminue à mesure que les produits de la réaction s'accumulent dans le milieu ; d'autre part, lorsque la raffino-lévulase a terminé son action, la seule hydrolyse qui se poursuive est celle du mélibiose ; ce dernier se transforme lentement à la façon du maltose.

On voit bien vite que, dès le troisième jour de l'expérience, la totalité du raffinose a subi l'inversion faible ; en effet, la solution contient par centimètre cube, 40 milligrammes de raffinose qui donnent, après inversion faible, 12 milligrammes de lévulose et 23 milligrammes de mélibiose ; ce mélange réduit environ 50 milligrammes de cuivre ; or, ce chiffre est presque atteint dès le second jour : l'expérience donne, à ce moment, 62 milligrammes dont il faut retrancher 14 milligrammes provenant des substances réductrices de la poudre elle-même.

Après 8 jours, l'hydrolyse du mélibiose n'est du reste pas encore terminée ; le dédoublement complet de 40 milligrammes de raffinose, donnerait 36 milligrammes du mélange lévulose, glucose et galactose, ce qui correspond à 70 milligrammes environ de cuivre, alors qu'on trouve seulement $78 - 14 = 64$ milligrammes.

En effet, après traitement par HCl à 12 p. 1000, au bain-marie à 100°, le pouvoir réducteur, pris sur 1 centimètre cube, subit une augmentation de 7-8 milligrammes de cuivre.

Le mycélium de *Botrytis* renferme donc une diastase capable d'hydrolyser le mélibiose ; ce ferment, comme la maltase, est endocellulaire, ne diffuse ni dans les liquides de culture, ni dans les macérés ; comme la maltase encore, il est peu abondant à l'intérieur des filaments, et ne transforme qu'avec lenteur le sucre auquel il s'attaque.

Dès lors, pas plus que le maltose, le mélibiose n'est assimilé directement par le *Botrytis cinerea* ; il subit, au contraire, une hydrolyse préalable ; ce dédoublement s'effectue à l'intérieur même des cellules et au fur et à mesure des besoins de l'orga-

nisme ; ainsi s'explique l'absence des produits de transformation dans les liquides de culture.

GENTIANOSE

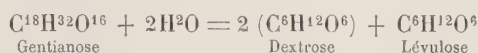
Le dédoublement du gentianose par les ferments solubles a été étudié dans les détails par Bourquelot (1). D'après cet auteur, l'invertine transforme le gentianose en lévulose et gentiobiose d'après l'équation :



L'action de l'invertine ne va pas au delà ; ce ferment est donc dépourvu de toute efficacité vis-à-vis du gentiobiose.

Au contraire, l'émulsine est capable d'hydrolyser le gentiobiose, tandis que son action est presque insignifiante sur le gentianose.

L'hydrolyse totale du gentianose d'après l'équation :



exige donc l'intervention de deux ferments : invertine, émulsine ; ces deux enzymes exercent leur action successivement, l'émulsine ne pouvant attaquer le gentiobiose qu'après la mise en liberté de ce dernier sous l'influence de l'invertine.

Ainsi s'explique que les macérations qui ne contiennent que l'un ou l'autre de ces ferments ou bien sont inefficaces sur le gentianose ou bien ne l'hydrolysent que jusqu'au stade inversion faible. Le liquide fermentaire de *Sterigmatorystis nigra* qui renferme, à la fois, de l'invertine et de l'émulsine, détermine, au contraire, le dédoublement total du gentianose.

Divers suc digestifs sont capables de provoquer l'inversion faible du gentianose sans aller au delà, tel, par exemple, le suc gastro-intestinal d'*Helix pomatia*, d'*Astacus fluviatilis* ; par contre, le suc pancréatique, les macérations de muqueuses intestinales des animaux supérieurs sont généralement sans action aucune sur le gentianose (2).

(1) Bourquelot. *C. R.*, CXXVI, p. 1045, 1898.

Bourquelot et Hérissé. *C. R.*, CXXXII, p. 574, 1901.

Bourquelot et Hérissé. *C. R.*, CXXXV, p. 399, 1902.

(2) Barthet et Bierry. *Soc. Biol.*, avril 1908.

J'ai essayé, sur le gentianose, l'action du liquide fermentaire et de la poudre mycélienne de *Botrytis cinerea* préparés à partir de mycéliums cultivés sur saccharose.

1° *Action du liquide fermentaire.* — On introduit dans un matras jaugé à 10 centimètres cubes, 339 milligrammes de gentianose rigoureusement pur ; on remplit jusqu'au trait de jauge avec le liquide fermentaire additionné de 1 p. 100 de NaF et on abandonne à l'étuve à 37°. On dispose parallèlement un matras témoin ne renfermant que du liquide fermentaire et deux autres matras pourvus l'un de saccharose, l'autre de raffinose.

L'hydrolyse totale du saccharose et l'inversion faible du raffinose sont rapidement atteintes ; la marche est sensiblement plus lente dans le matras à gentianose. Pour suivre les transformations successives du triose, j'ai prélevé, à diverses reprises, 1 centimètre cube du mélange et effectué les dosages à la liqueur cupropotassique ; je suis arrivé aux résultats suivants :

Intervalle des dosages :		Cuivre réduit par cc.
Dosage initial.....		9 mg.
Après 2 jours.....		23 —
— 6 —		55 —
— 10 —		62 —
— 14 —		67 —

Le matras témoin ne renfermant que du liquide fermentaire réduit, à la fin comme au début de l'expérience, 9 milligrammes de cuivre par centimètre cube.

Un calcul très simple indique que 33 milligrammes de gentianose introduits par centimètre cube réduiraient, après avoir subi l'inversion faible, 50 milligrammes de cuivre, et 67 si le gentiobiose était hydrolysé à son tour.

Dès lors, on voit immédiatement que, dans l'expérience précédente, le dédoublement du gentianose se poursuit au delà du stade inversion faible à peu près atteint dès le sixième jour ; toutefois, le gentiobiose n'est que lentement transformé, et son dédoublement n'est pas encore achevé après le quatorzième jour, lorsqu'on effectue le dernier dosage ; si l'on porte, en effet, 1 centimètre cube de la liqueur à l'autoclave à 110° en présence de SO^4H^2 à 3 p. 100, suivant les indications de

Bourquelot, le dosage révèle une augmentation du pouvoir réducteur correspondant à 8-9 milligrammes de cuivre.

2° *Action de la poudre mycélienne.* — On obtient des résultats semblables lorsqu'on emploie, comme source de ferments, le mycélium lui-même; cependant l'hydrolyse du gentiobiose est, dans ce cas, sensiblement plus rapide.

On introduit 0^{gr},878 de gentianose dans un matras de 50 centimètres cubes, renfermant des fragments de mycélium lavés à fond sur filtre Büchner et de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. L'antiseptique est NaF à 1 p. 100; on opère à l'étuve à 36°.

Voici le résultat des dosages effectués sur 2 centimètres cubes.

Intervalle des dosages :		Cuivre réduit par 2 cc.
Dosage initial.....		0 mg.
Après 4 jours.....		60 —
— 8 —		65 —
— 12 —		68 —

Le matras témoin ne renfermant que le mycélium en suspension dans l'eau distillée n'acquiert, au cours de l'expérience, aucun pouvoir réducteur.

Dès le quatrième jour, le stade inversion faible est dépassé; le pouvoir réducteur augmente ensuite lentement, à mesure que le gentiobiose s'hydrolyse à son tour; au moment du dernier dosage, le dédoublement est bien près de son terme; le traitement à l'acide sulfurique, effectué comme précédemment, ne détermine plus, dans les dosages, qu'une augmentation de 4-5 milligrammes de cuivre. D'autre part, le pouvoir rotatoire, à la fin de l'expérience, devient égal à -17° : or, le gentianose, après hydrolyse totale, donne un mélange de sucre dont le pouvoir rotatoire est égal à -20° .

Le *Botrytis cinerea* est donc capable d'hydrolyser à fond le gentianose et le liquide fermentaire a ce pouvoir aussi bien que la poudre mycélienne; à ce point de vue, le gentianose se distingue nettement d'autres trisaccharides tels que le raffinose dont l'hydrolyse, sous l'action du liquide fermentaire, ne dépasse jamais le stade inversion faible; ces faits serviront à résoudre le problème de l'individualité des diastases qui interviennent dans l'un et l'autre cas.

STACHYOSE

Le stachyose, identifié par C. Tanret (1) avec le mannéotétrose est un tétrasaccharide : $C^{24}H^{42}O^{31}$; les cristaux qui se sont déposés de l'alcool à 90° possèdent quatre molécules d'eau de cristallisation.

Le dédoublement du stachyose, sous l'influence des acides étendus, s'effectue en deux phases : dans la première, il se forme du lévulose et un trisaccharide, le manninotriose ; l'action de l'acide acétique ne pousse pas l'hydrolyse au delà de ce stade ; dans la deuxième phase, le manninotriose est attaqué à son tour et se transforme en deux molécules de galactose et une molécule de glucose.

Les ferments se montrent actifs vis-à-vis du stachyose. C. Tanret (2) signalait, dès 1902, que les diastases du *Sterigmatocystis nigra* et de la Levure déterminent l'inversion faible du mannéotétrose ; plus tard, l'auteur s'aperçut que ces ferments agissent également sur le manninotriose en mettant en liberté du galactose et du glucose, mais cette action est extrêmement lente ; ce n'est qu'après 11 mois que des solutions créosotées de mannéotétrose, additionnées les unes d'émulsine, les autres d'une macération de *Sterigmatocystis*, ont présenté, dans la déviation polarimétrique, des différences de plusieurs degrés.

Bierry et Barthet (3) ont étudié le dédoublement du mannéotétrose et du manninotriose par le suc gastro-intestinal d'*Helix pomatia*. Ils ont constaté, sous l'action de ce suc, une augmentation du pouvoir réducteur et une baisse dans la rotation, cette diminution étant plus rapide avec le tétrose qu'avec le triose ; mais dans l'un et l'autre cas, après un temps suffisamment long et avec une quantité convenable de suc gastro-intestinal, on arrive à une hydrolyse totale du manninotriose.

Voici le résultat de mes expériences sur l'hydrolyse du stachyose par le *Botrytis cinerea*. J'ai étudié parallèlement, comme à l'ordinaire, l'action, sur le stachyose, du liquide ferment-

(1) C. Tanret. *Bull. Soc. chim.*, 3^e série, t. 29, p. 888, 1903.

(2) C. Tanret. *C. R.*, CXXXIV, p. 1588, juin 1902.

(3) Bierry et Barthet. Le dédoublement du manninotriose. *C. R. Soc. Biol.*, LXVI, p. 13, janvier 1909.

taire et du mycélium de *Botrytis*. Ne pouvant me permettre des cultures sur stachyose, en raison de la petite quantité de produit dont je disposais, j'ai fait usage, pour préparer le liquide et la poudre fermentaire, d'un mycélium venu sur saccharose.

1° *Action du liquide fermentaire.* — On introduit dans un matras de 25 centimètres cubes, 289 milligrammes de stachyose parfaitement pur et du liquide fermentaire additionné de NaF à 1 p. 100. On abandonne à l'étuve à 36° ce matras ainsi que le témoin qui ne renferme que du liquide fermentaire. Les dosages à la liqueur de Fehling sont effectués, de distance en distance, sur 5 centimètres cubes; en voici le résultat :

Intervalle des dosages :		Cuivre réduit par 5 cc.
Dosage initial.....		20 mg.
Après 4 jours.....		62 —
— 8 —		80 —
— 12 —		83 —

Le liquide fermentaire du matras témoin, dosé sur 5 centimètres cubes, réduit 20 milligrammes de cuivre.

Connaissant la quantité de stachyose que renferment les 5 centimètres cubes prélevés pour chaque dosage, calculons le poids de cuivre qui serait réduit par ce stachyose s'il subissait successivement l'inversion faible et l'inversion forte. On trouve immédiatement que 58 milligrammes de stachyose se transforment, par hydrolyse faible, en 39 milligrammes de mannitriose et 14 milligrammes de lévulose, mélange qui réduit sensiblement 54 milligrammes de cuivre. Or, le dernier dosage du tableau précédent donne 83 milligrammes de cuivre dont il faut retrancher les 20 milligrammes du dosage initial, uniquement attribuables aux substances réductrices contenues dans l'extrait; il reste donc 63 milligrammes, ce qui indique que le stade inversion faible du stachyose est largement atteint, peut-être même dépassé après 12 jours d'expérience.

Supposons atteinte l'inversion forte: le mélange de 14 milligrammes de lévulose, 14 milligrammes de glucose et 28 milligrammes de galactose résultant de l'hydrolyse totale de 58 milligrammes de stachyose, réduirait 108 milligrammes de

cuivre. Le liquide fermentaire réussirait-il à pousser le dédoublement du stachyose jusqu'au stade inversion forte? L'expérience n'a pas été poursuivie suffisamment pour qu'il soit permis de l'affirmer; toutefois, les derniers dosages indiquent assez que l'hydrolyse du manninotriose, si elle a lieu sous l'action du liquide fermentaire, ne se produit qu'avec une extrême lenteur.

2° *Action de la poudre mycélienne.* — Le stachyose s'hydrolyse beaucoup plus facilement au contact du mycélium lui-même; ainsi que le prouvent les expériences suivantes.

1° Le stachyose est introduit à raison de 0 gr. 490, dans des matrâs de 25 centimètres cubes; on ajoute de menus fragments de mycélium et de l'eau distillée antiseptisée par NaF; on abandonne à l'étuve à 36°; après 18 jours on fait l'examen polarimétrique et l'on trouve le pouvoir rotatoire égal à $+49^{\circ}$; le stachyose n'est donc pas loin, à ce moment, d'être totalement hydrolysé, le mélange de sucres résultant de l'inversion forte du stachyose ayant un pouvoir rotatoire égal à $+39^{\circ}$.

2° L'expérience suivante indique la marche générale de l'hydrolyse: on dispose un matrâs identique au précédent, et, par intervalles, on dose la liqueur sur 1 centimètre cube; on obtient les chiffres suivants:

Intervalle des dosages:		Cuivre réduit par cc.
Dosage initial.....		traces
Après 3 jours.....		18 mg.
— 5 —.....		24 —
— 11 —.....		35 —
— 16 —.....		39 —

Après 20 jours, on fait un dernier prélèvement et on dose sur 1 centimètre cube, avant et après inversion; on trouve respectivement 40 et 47 milligrammes de cuivre.

On se rend compte, par un calcul très simple, que dès le cinquième jour, le stade inversion faible du stachyose est atteint; le manninotriose est ensuite hydrolysé lentement, son dédoublement est loin d'être complet, après 20 jours de contact avec la poudre mycélienne.

Comment s'effectue la transformation du manninotriose? Y a-t-il, dans une première phase, formation d'un biose qui

s'hydrolyse ensuite? C'est une question sur laquelle je me propose de revenir plus tard.

MÉLÉZITOSE

1° *Liquide fermentaire*. — D'après Bourquelot et Hérissé(1), le liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra* est capable de conduire le dédoublement du mélézitose jusqu'au stade inversion faible.

Je suis arrivé à un résultat semblable avec le liquide fermentaire de *Botrytis cinerea*.

Le liquide fermentaire a été additionné de NaF à raison de 1 p. 100 et mis au contact de la solution de mélézitose. Le pouvoir réducteur du mélange, mesuré sur 1 centimètre cube, est monté constamment durant les trois premiers jours, après quoi il n'a plus augmenté sensiblement. Le liquide, décanté après cinq jours et passé au polarimètre, avait un pouvoir rotatoire égal à $+ 64^{\circ}$: le mélézitose était donc à peu près intégralement transformé en glucose et turanose.

2° *Extrait mycélien*. — L'extrait obtenu après broyage du mycélium se montre doué des mêmes propriétés que le liquide fermentaire. Il mène l'hydrolyse jusqu'au stade inversion faible, mais son action est nulle ensuite sur le turanose.

3° *Poudre fermentaire*. — La poudre fermentaire peut, au contraire, pousser l'hydrolyse du mélézitose, mais assez lentement toutefois, jusqu'au stade inversion forte.

On prépare les quatre mélanges suivants :

I	{	Mycélium cru.....	300 mg.	II	{	Mycélium cru.....	300 mg.
		Mélézitose.....	250 —			Eau distillée Q. S.....	25 cc.
		Eau distillée Q. S.....	25 cc.			Eau distillée Q. S.....	25 cc.
III	{	Mycélium chauffé.....	300 mg.	IV	{	Mycélium chauffé.....	300 mg.
		Mélézitose.....	250 —			Eau distillée Q. S.....	25 cc.
		Eau distillée Q. S.....	25 cc.			Eau distillée Q. S.....	25 cc.

Antiseptique : NaF; température : 36° .

Après 6 jours, on effectue, sur 2 centimètres cubes, les dosages avant et après inversion :

(1) Bourquelot et Hérissé. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, (6), t. IV, p. 385, 1896.

	Cuivre par 2 cc.	
	Avant inversion :	Après inversion :
I.....	38 mg.	40 mg.
II.....	8 —	40 —
III.....	8 —	39 —
IV.....	6 —	8 —

L'hydrolyse du mélézitose est donc à peu près totale dans le matras à poudre fermentaire n'ayant pas subi de traitement à l'autoclave.

LACTOSE

1° *Liquide fermentaire*. — Il est généralement difficile d'obtenir la lactase en solution, par la méthode des liquides fermentaires, même en s'adressant à des organismes qui végètent bien sur le sucre de lait. On sait, par exemple, qu'un grand nombre de Levures, mises à macérer dans l'eau, abandonnent leur invertine sans céder la lactase (1). Le mycélium du *Sterigmatocystis nigra*, cultivé sur lactose, grâce à l'artifice imaginé par Duclaux, donne un liquide fermentaire totalement inactif vis-à-vis du lactose, ce qui a fait dire à Bourquelot que le *Sterigmatocystis nigra* ne contient pas de lactase; il en serait de même, d'après cet auteur, du *Penicillium crustaceum* et du *Polyporus sulfureus*. Cependant l'*Eurotiosis Gayoni* fournit un macéré capable de dédoubler le sucre de lait (2).

Le liquide fermentaire de *Botrytis cinerea* ne renferme pas de lactase. Voici une des expériences qui me permettent de l'affirmer.

Deux séries de matras sont placés à l'étuve à 36-37°; chaque matras renferme le même volume d'une solution de lactose additionnée de liquide fermentaire, intact dans la première série, bouilli dans la seconde. Les milieux sont antiseptisés par le toluène; il faut préférer le toluène au fluorure de sodium, ce dernier exerçant, d'après Brachin, une action retardatrice sur la lactase. Après quatre jours, on effectue les dosages avant et après inversion, sur 1 centimètre cube :

Matras non bouilli	(Avant inversion....	60 mg. de cuivre.
	(Après : — ...	87 —

(1) Duclaux. *Microbiologie*, II, p. 526.

(2) Laborde. *Loc. cit.*, p. 48.

Matras bouilli	{ Avant inversion...	61 mg. de cuivre.
	{ Après — ...	88 —

Le lactose reste donc absolument intact en présence du liquide fermentaire.

2° *Extrait mycélien*. — On obtient plus facilement un macéré actif sur le lactose, lorsqu'on soumet les cellules à un écrasement préalable. Par ce procédé, Pottevin (1) aurait réussi à préparer une solution de lactase, à partir du mycélium du *Sterigmatocystis nigra* venu sur lactose. Cependant, Brachin (2) déclare avoir répété l'expérience sans aucun succès.

Les grains de Kéfy, après broyage et macération dans l'eau chloroformée, ont donné à Fischer un macéré hydrolysant le lactose. Dienert (3) signale le même fait pour d'autres Levures sur lactose; l'un et l'autre remarquent, du reste, que les solutions diastasifères ainsi obtenues sont douées d'une activité très faible.

Au contraire, le mycélium d'*Eurotiosis Gayoni*, trituré avec du sable et mis à digérer durant quelques heures dans de l'eau thymolysée, fournit un macéré assez actif pour hydrolyser, en 48 heures, une solution de lactose à 2 p. 100 (4).

On obtient des résultats tout autres avec le *Botrytis cinerea*; même après écrasement du mycélium, le macéré reste incapable de dédoubler le sucre de lait, ainsi qu'en témoigne l'expérience suivante.

On introduit dans une première série de matras une solution de lactose et l'extrait mycélien non bouilli; dans la seconde série, la même solution de lactose et le macéré préalablement bouilli. On abandonne à l'étuve à 36-37°. Après trois jours, on effectue les dosages; on trouve, pour le cuivre :

Matras non bouillis	{ Avant inversion...	92 mg. par cc.
	{ Après — ...	122 —
Matras bouillis	{ Avant — ...	91 —
	{ Après — ...	121 —

On replace les matras à l'étuve et cinq jours après, on dose

(1) Pottevin. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVII, p. 46, 1903.

(2) Brachin. *Recherches sur la lactase. Thèse de Pharmacie*, Paris, 1904, p. 39.

(3) Dienert. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, p. 178.

(4) Laborde. *Loc. cit.*, p. 50.

de nouveau : les résultats sont identiques. Les matras témoins, ne renfermant que l'extrait additionné d'eau distillée, réduisent, à la fin de l'expérience comme au début, 25 milligrammes de cuivre par centimètre cube et dès lors, il est facile de se rendre compte, par un calcul très simple, que le glucose et le galactose trouvés après hydrolyse à l'acide chlorhydrique étendu, correspondent bien au lactose introduit.

Il faut conclure de ces faits que la lactase est totalement absente de l'extrait mycélien.

3° *Poudre fermentaire.* — Pour mettre en évidence, dans le *Botrytis*, un principe susceptible d'hydrolyser le lactose, il faut s'adresser au mycélium lui-même.

On recueille le mycélium d'une culture parvenue à la fin de son développement ; on le dessèche à la température du laboratoire et on le pulvérise. Une partie de la poussière ainsi préparée est légèrement humectée d'eau distillée, puis portée à l'autoclave à 120° pendant deux heures. On dispose alors deux séries de fioles à hydrolyse, renfermant, avec une même solution de lactose, les unes la poudre mycélienne crue, les autres la poudre traitée à l'autoclave. On abandonne à l'étuve à 36°, pendant six jours, on dose ensuite sur 1 centimètre cube :

Mycélium cru.....	74 mg. de cuivre.
Mycélium chauffé.....	56 — —

J'ai contrôlé ces résultats par les osazones ; à cette fin, les matras précédents sont déféqués au nitrate mercurique et additionnés, après filtration, de phénylhydrazine acétique ; le mercure est précipité par le réactif ; après quelques instants de chauffe douce au bain-marie, on filtre ; on abandonne alors les matras, durant une heure et demie, au bain-marie à 100°. Il s'est formé avec les liquides provenant des matras à mycélium cru, un abondant précipité d'osazone, insoluble dans l'eau bouillante, insoluble dans l'alcool méthylique, possédant les caractères microscopiques et le point de fusion de la glucosazone ; avec les autres matras, il ne s'est produit à chaud aucun précipité, mais, par refroidissement, la liqueur laisse déposer de la lactosazone qui se redissout intégralement à chaud.

Il est facile, toutefois, de constater que le dédoublement du

lactose opéré par la poudre fermentaire n'est pas intégral. En effet, à 59 milligrammes de cuivre trouvés par centimètre cube dans les matras à mycélium chauffé, correspondraient théoriquement, après hydrolyse totale du sucre de lait, 83 milligrammes de cuivre, et l'expérience ne donne que 74. En tenant compte des traces de cuivre qui proviennent des substances réductrices restées dans la poudre fermentaire, on voit que les deux tiers environ du lactose initial ont subi l'hydrolyse.

Le dédoublement du lactose, quoique très lent, n'en est pas moins réel, et le mycélium possède donc bien, à l'égard du lactose, des propriétés hydrolysantes qui n'appartiennent ni au liquide de culture, ni au liquide fermentaire, ni à l'extrait mycélien.

L'ensemble de ces résultats démontre qu'on peut établir un parallélisme rigoureux entre le lactose et le maltose, au point de vue de l'assimilation de ces deux sucres par le *Botrytis cinerea*.

Puisqu'il existe, à l'intérieur des cellules, un ferment spécifique du lactose, ce dernier ne doit être assimilé qu'indirectement, c'est-à-dire après transformation préalable en glucose et galactose.

Quant au ferment lui-même, il est, comme la maltase, strictement *endocellulaire*.

De plus, il n'est présent dans les cellules qu'en *petite quantité*; en faisant servir à plusieurs hydrolyses successives la même poudre mycélienne, on constate que, dès la seconde opération, les propriétés actives de cette poudre sont déjà notablement atténuées.

On comprend, dès lors, pourquoi le liquide des cultures de *Botrytis* sur lactose ne renferme jamais ni glucose ni galactose : le sucre de lait subissant une hydrolyse très lente à l'intérieur des cellules, les produits de dédoublement disparaissent, utilisés par la moisissure, au fur et à mesure de leur mise en liberté.

Production d'émulsine par le Botrytis cinerea. — Dans l'étude des actions fermentaires exercées par un organisme, il importe de rechercher parallèlement la lactase et l'émulsine, en raison des problèmes de spécificité se rapportant à ces deux diastases.

J'ai donc essayé de caractériser l'émulsine dans le liquide fermentaire, dans l'extrait mycélien et dans la poudre fermentaire de *Botrytis cinerea*, en prenant comme réactif l'amygdaline et me bornant à constater le dédoublement de ce glucoside sans entrer dans le détail du mécanisme d'hydrolyse.

Les résultats tiennent en peu de mots: le liquide fermentaire aussi bien que l'extrait mycélien et la poudre fermentaire préparés à partir de mycéliums venus sur lactose, se montrent constamment doués de la propriété d'hydrolyser l'amygdaline; on s'en aperçoit à l'odeur prononcée d'aldéhyde benzoïque que dégagent rapidement les mélanges et à l'augmentation progressive de leur pouvoir réducteur.

TRÉHALOSE

Le tréhalose ne se laisse que très difficilement dédoubler, par les acides étendus, en deux molécules de glucose. Cependant un grand nombre de Levures et diverses moisissures se montrent capables d'effectuer cette hydrolyse; le liquide fermentaire de *Sterigmatocystis nigra* (1), notamment, est actif vis-à-vis du tréhalose; de même aussi le macéré d'*Eurotiosis Gayoni* (2). Le ferment spécifique du tréhalose, la *tréhalase*, est du reste très répandu chez les champignons, comme l'ont montré les recherches de Bourquelot et Hérissé (3).

1° *Action du liquide fermentaire de Botrytis.* — Le liquide fermentaire de *Botrytis* ne renferme aucun principe susceptible d'hydrolyser le tréhalose; même en prolongeant l'expérience pendant six jours, à l'étuve à 37°, le mélange de sucre et de macéré n'offre pas de pouvoir réducteur appréciable. Je me suis servi, pour la préparation du liquide fermentaire, de mycélium venu sur maltose, les cultures sur tréhalose ne m'ayant fourni qu'une quantité de moisissure insuffisante. Le sucre dont j'ai fait usage dans cette expérience et dans les suivantes était du tréhalose rigoureusement pur, retiré par M. Tanret du seigle ergoté.

(1) Bourquelot, *C. R.*, CXVI, p. 826, 1893.

(2) Laborde, *Loc. cit.*, p. 53.

(3) Bourquelot et Hérissé, *C. R.*, CXXXIX, p. 874, 1904.

2° *Extrait mycélien*. — C'est également au mycélium venu sur maltose que j'ai eu recours pour préparer un extrait mycélien. Obtenu comme à l'ordinaire par macération de la bouillie mycélienne, cet extrait réduisait 11 milligrammes de cuivre par centimètre cube. Dans de petits matras, jaugés à 10 centimètres cubes, j'ai effectué les mélanges suivants :

I	Trehalose.....	200 mg.	II	Tréhalose.....	200 mg.
	Extrait cru.....	5 cc.		Extrait bouilli.....	5 cc.
	Eau distillée Q. S.....	10 cc.		Eau distillée Q. S.....	10 cc.

Antiseptique : NaF, à 1 p. 100; température : 36°.

Les milieux étaient rendus très légèrement acides par l'acide acétique introduit en même proportion que dans les expériences correspondantes sur maltose.

J'ai effectué sur ces mélanges quatre dosages successifs dont je donne les résultats exprimés en cuivre par centimètre cube :

Après 2 jours...	Matras I : 45 mg.	Matras II : 6 mg.
— 5 — ...	— 22 —	— 6 —
— 7 — ...	— 29 —	— 6 —
— 9 — ...	— 30 —	— 6 —

Dans les matras à extrait bouilli, il ne s'effectue pas trace d'hydrolyse; on retrouve, en effet, en tenant compte de la dilution, la même quantité de cuivre que dans les dosages préalables de l'extrait.

Le dédoublement du tréhalose se poursuit lentement dans le matras à extrait non bouilli; même après neuf jours, l'hydrolyse est loin d'être totale; en effet, après dédoublement complet du tréhalose, il devrait exister dans la liqueur, par centimètre cube, 19 milligrammes de glucose qui réduisent 38 milligrammes de cuivre; or le dernier dosage ne donne que 30 milligrammes, dont il faut encore retrancher 6 milligrammes résultant du pouvoir réducteur de l'extrait. Si, du reste, on traite au bain-marie, avec HCl étendu, un centimètre cube de la liqueur, on obtient, au dosage, 45 milligrammes de cuivre.

L'activité de l'extrait mycélien sur le tréhalose est donc extrêmement faible. Bourquelot a déjà attiré l'attention sur la lenteur avec laquelle le liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra* hydrolyse le tréhalose. Peut-être, en opérant sur une quantité de produit plus considérable qui permette de pour-

suivre l'expérience au delà de 9 jours, verrait-on l'extrait mycélien de *Botrytis cinerea* transformer intégralement le tréhalose en glucose.

3° *Poudre fermentaire*. — L'hydrolyse du tréhalose est bien autrement rapide si l'on opère avec la poudre mycélienne. Je me suis servi, pour cette expérience encore, d'un mycélium cultivé sur maltose, afin de pouvoir rigoureusement comparer l'action de l'extrait et celle de la poudre.

Après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, l'hydrolyse du tréhalose est déjà fortement avancée dans les matras à poudre fermentaire ; après trois jours, elle est complète, le traitement par l'acide chlorhydrique étendu, au bain-marie à 100°, ne détermine plus, en effet, aucune augmentation du pouvoir réducteur.

Il ne peut donc subsister aucun doute relativement à l'assimilation indirecte, c'est-à-dire après hydrolyse préalable, du tréhalose par le *Botrytis cinerea*, du moment que j'ai réussi à caractériser avec certitude, dans le mycélium, un ferment capable de faire subir à ce sucre un dédoublement total.

D'autre part, le ferment relatif au tréhalose présente les plus grandes analogies avec la maltase ; comme elle, il reste localisé à l'intérieur des filaments sans se répandre ni dans le liquide de culture, ni dans le liquide fermentaire, sans se laisser extraire, sinon en quantité minime, par la méthode de la macération aqueuse. C'est donc encore un ferment qui se range dans le groupe maltase, lactase, mélibiase, etc.

*
* *

La plupart des enzymes caractérisés dans ce chapitre se laissent rapprocher, par leurs propriétés, de l'une ou l'autre des diastases prises comme types extrêmes, l'invertine et la maltase.

A côté de l'invertine, se placent les enzymes qui déterminent l'hydrolyse partielle des polysaccharides, raffinose, gentianose, stachyose. Je ne discute pas, pour l'instant, la question de leur identification possible avec l'invertine. Je me borne à constater que ces ferments, en admettant qu'ils aient chacun leur individualité, possèdent les mêmes pro-

priétés de diffusibilité que l'invertine et sont élaborés, comme elle, en quantité appréciable par le mycélium.

Les autres diastases présentent, au contraire, tous les caractères de la maltase. Principalement pour ce qui est de la lactase, de la tréhalase et de la mélibiose, cette communauté de caractères est si évidente, qu'il y a lieu de se demander si ces trois ferments ne doivent pas être identifiés avec la maltase. Ils sont, en effet, strictement endocellulaires au point de ne passer jamais ni dans le liquide de culture, ni dans les macérés; de plus, ils sont produits en très petite quantité de sorte que l'on pourrait douter qu'ils constituent véritablement des principes individualisés, différents du protoplasme lui-même.

Pour les moisissures, telles que le *Botrytis*, qui n'ont de prédilection marquée pour aucun sucre et manifestent par conséquent une grande indifférence vis-à-vis du substratum, il ressort des observations précédentes que la plupart de leurs actions diastasiques s'effectuent à l'intérieur des filaments, sans que rien trahisse au dehors ces dédoublements intracellulaires.

C'est là un fait d'expérience et qui semble très général; il faut donc se défaire de cette idée que toute hydrolyse diastasique se traduit à l'extérieur par une diffusion abondante de ferment.

CHAPITRE III

RELATIONS ENTRE LE SUCRE ALIMENTAIRE
ET LES DIASTASES SÉCRÉTÉES

J'ai montré, dans les deux chapitres qui précèdent, qu'à chacun des sucres étudiés correspond, chez le *Botrytis*, un ferment — parfois deux — capable de transformer ce sucre en ses produits de dédoublement.

Toutefois, les mycéliums dans lesquels j'ai recherché ces différentes diastases n'avaient pas une provenance quelconque : c'est dans le mycélium de cultures sur maltose que la maltase a été caractérisée ; pareillement, je n'ai mis en évidence l'invertine, la raffino-lévulase, la lactase, etc., que dans le cas où les sucres servant d'aliment au mycélium, étaient respectivement : le saccharose, le raffinose, le lactose, etc.

Une question d'ordre plus général surgit immédiatement, celle des relations entre le sucre alimentaire et la diastase sécrétée.

Duclaux pose admirablement ce problème dans les termes que voici : « Soit une cellule pouvant vivre aux dépens de diverses substances qui, comme le sucre candi, l'amidon, la caséine, ont besoin, avant de devenir assimilables, alimentaires, de subir l'action d'une diastase spéciale à chacune d'elles. Cette cellule sécrète-t-elle, d'une façon constante et en quelque sorte nécessaire, toutes les diastases qu'elle a le pouvoir ou l'occasion d'utiliser ; ou bien la production de ces diastases est-elle intermittente, subordonnée aux conditions d'alimentation et liée à la présence de l'aliment qu'il s'agit de digérer (1) ? »

Le problème, restreint aux végétaux, a généralement reçu solution dans le sens d'une certaine spécialisation des ferments en rapport avec le substratum alimentaire.

Il y a bien longtemps déjà que Béchamp (2) faisait remar-

(1) Duclaux. *Microbiologie*, t. II, p. 83.

(2) Béchamp. *Ann. de Chim. et de Phys.*, XIII, p. 444, 1868.

quer « que s'il y a des fermentations spécifiques, il n'y a point de ferments spécifiques.... Ce qu'il y a, ce sont des organismes qui provoquent ou opèrent des transformations de la nature de l'aliment qu'on leur fournit. »

On sait qu'une espèce appelée à tort par Duclaux *Aspergillus glaucus* (1) ainsi que le *Penicillium crustaceum*, cultivés sur lactate de chaux, en présence des sels minéraux indispensables, ne sécrètent ni présure, ni caséase, mais seulement de l'amylase (*Aspergillus*) ou de la sucrase (*Penicillium*); la présure et la caséase font également défaut dans les cultures sur saccharose; on les trouve, au contraire, en abondance dans les cultures sur lait.

On pourrait multiplier les exemples de ce genre; Went (2), notamment, en cite un grand nombre dans une étude relative à l'influence de l'aliment sur les sécrétions diastasiques.

Le problème que j'envisage ici est plus particulier : ne considérant que les sucres étudiés et les ferments qui s'y rapportent, je me demande si la présence, dans le milieu de culture, d'un sucre déterminé est une condition rigoureusement indispensable pour que le mycélium différencie l'enzyme qui correspond à ce sucre.

On peut, à ce sujet, se poser les questions suivantes :

1° Un mycélium venu sur glucose, par exemple, et, en général, sur un sucre n'ayant besoin de subir aucun dédoublement antérieur à son assimilation, élabore-t-il des ferments solubles; produit-il la plupart des ferments dont nous avons reconnu l'existence en faisant varier le sucre alimentaire ?

2° Lorsque le sucre de la culture est un polysaccharide, la fonction diastasigène subit-elle une spécialisation telle, que la seule diastase relative à ce sucre soit différenciée par le mycélium; ou bien, au contraire, d'autres diastases apparaissent-elles qui sont sans action sur ce polysaccharide ?

Il existe, dans la littérature des ferments, quelques données classiques se rapportant à ce problème particulier.

(1) Duclaux. *Microbiologie*, t. II, p. 83. Cette espèce indéterminée n'est pas l'*Aspergillus glaucus* des auteurs.

(2) Went. *Loc. cit.*, p. 611.

Tout d'abord, en ce qui concerne les Levures, Bourquelot (1) a établi « que la Levure de bière, en activité dans une solution de glucose ou de sucre de canne, ne produit pas de ferment capable de dédoubler le maltose. Par contre, lorsqu'elle se trouve dans une solution de ce dernier sucre, elle sécrète un ferment qui le dédouble ». C'est donc la présence de l'aliment qui a déterminé la sécrétion de l'enzyme spécifique.

Les expériences suivantes dues à Pottevin (2), conduisent à la même conclusion.

Considérons le lactose qu'on regarde généralement comme un galactoside et les deux méthyl-d-galactosides stéréoisomères α et β .

On sait que le liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra* cultivé sur liquide Raulin ne contient pas de lactase. Cependant si l'on cultive le *Sterigmatocystis* sur lactose, selon la méthode préconisée par Duclaux, on peut obtenir, à la condition de broyer le mycélium avant de le mettre à macérer, un extrait actif à la fois sur le lactose et sur le méthyl-d-galactoside β , mais respectant le méthyl-d-galactoside α .

Si, au lieu d'un liquide Raulin lactosé, on introduit sous le *Sterigmatocystis*, une solution de méthyl-d-galactoside β , ce produit est consommé et la macération de la plante broyée est active sur le lactose et le méthyl-d-galactoside β , sans action sur le méthyl-d-galactoside α .

Mais vient-on à introduire sous la plante le méthyl-d-galactoside α , ou simplement, en raison de la difficulté d'isoler ce produit de son isomère, le mélange des deux méthyl-d-galactosides α et β , on obtient une macération active à la fois sur le lactose et sur les deux galactosides.

Pottevin, qui a obtenu ces résultats, en conclut qu'étant donnée une plante telle que le *Sterigmatocystis nigra*, ne sécrétant pas normalement de lactase, on peut, en variant la nature de l'aliment qu'on lui offre, lui faire sécréter chacune des deux lactases stéréoisomères.

Voici maintenant des données de sens contraire quoique relatives au même *Sterigmatocystis nigra*. On sait, en effet,

(1) Bourquelot. *Jour. de l'Anat. et de la Physiol.* 1886, p. 204.

(2) Pottevin. *Ann. Inst. Pasteur*, XVII, p. 49, 1903.

que le liquide fermentaire de cette moisissure est susceptible d'hydrolyser un grand nombre de sucres : saccharose, maltose, raffinose, etc. Or, pour préparer le liquide fermentaire, la méthode classique consiste à faire macérer, dans l'eau distillée, un mycélium venu sur liquide Raulin, en s'adressant à des cultures parvenues au terme de leur développement. Mais pratiquement un tel mycélium ne se trouve que deux jours environ au contact d'une solution renfermant du sucre de canne; dans la suite, c'est sur du sucre interverti, donc sur un milieu dont les éléments sont directement assimilables, que se poursuit l'évolution de la moisissure. Dans de telles conditions, les ferments spécifiques de la plupart des sucres complexes sont élaborés par le mycélium.

Voici les documents que j'ai pu recueillir relativement à cette question, au cours de mes recherches sur le *Botrytis cinerea*.

Il est à peine besoin de faire remarquer que dans les cultures qui m'ont servi à étudier l'influence des sucres sur les sécrétions diastasiques, je n'ai fait varier qu'un seul élément, le sucre; toutes les autres conditions, composition chimique et réaction du milieu, température, humidité, éclaircissement, étaient maintenues aussi identiques que possible.

I. — FERMENTS ÉLABORÉS PAR LE BOTRYTIS CINEREA CULTIVÉ SUR GLUCOSE.

J'ai recherché les diverses diastases, à la fois dans le liquide fermentaire et dans la poudre mycélienne.

L'activité du *liquide fermentaire* est restreinte à un petit nombre de sucres; seuls le saccharose, le mélézitose, le raffinose, le stachyose, le gentianose se laissent hydrolyser par le liquide fermentaire.

Voici les expériences qui justifient cette affirmation :

1° *Hydrolyse du saccharose*. — On place à l'étuve à 36°, pendant 48 heures, deux séries de matras renfermant chacun environ 5 grammes p. 100 de saccharose en solution dans le liquide fermentaire. Les dosages, avant et après inversion donnent, pour le cuivre réduit, les chiffres suivants :

Série non bouillie	{ Avant inversion.....	88 mg. par cc.
	{ Après —	90 —
Série bouillie	{ Avant —	15 —
	{ Après —	91 —

L'inversion du saccharose par le liquide fermentaire est donc pratiquement totale.

2° *Hydrolyse du raffinose*. — Les matras mis en expérience à l'étuve à 36° renferment chacun 10 centimètres cubes d'une solution de raffinose à 10 p. 100 et 15 centimètres cubes de liquide fermentaire. Après cinq jours, on obtient, par centimètre cube, 48 milligrammes de cuivre. Il est facile de se rendre compte que l'hydrolyse est allée jusqu'au stade inversion faible, c'est-à-dire tout aussi loin que si l'on avait opéré avec le liquide fermentaire d'un mycélium venu sur raffinose. Les mélanges témoins, dans lesquels le liquide fermentaire a été préalablement porté à l'ébullition, n'ont acquis, pendant l'expérience, aucun pouvoir réducteur.

3° *Hydrolyse du mélézitose et du stachyose*. — Des expériences semblables, sur le mélézitose et le stachyose m'ont démontré que l'hydrolyse de ces deux sucres, sous l'influence des macérés obtenus à l'aide de mycéliums venus sur glucose, est poussée jusqu'au stade inversion faible.

4° *Hydrolyse du gentianose*. — Au contraire, ce stade est dépassé avec le gentianose, ce qui prouve l'activité du liquide fermentaire sur le gentiobiose.

Les autres sucres étudiés, maltose, lactose, mélibiose, turanose, résistent à l'action du liquide fermentaire.

Il en va tout autrement si l'on expérimente avec la *poudre mycélienne*; on arrive alors à hydrolyser non seulement le saccharose et les sucres qui s'y rapportent, mais encore les sucres précédemment énumérés, maltose, lactose, etc.

1° *Hydrolyse du maltose*. — On prépare, comme à l'ordinaire, deux séries de fioles à hydrolyse : les unes renferment la solution de maltose et la poudre fermentaire crue, on introduit dans les autres la même solution de maltose et un poids égal de poudre fermentaire préalablement portée à 120° pendant une heure. Un matras témoin ne renferme que la poudre

mycélienne en suspension dans l'eau distillée. On abandonne à l'étuve à 36° pendant trois jours et on dose :

	Cuivre par cc.	
	Avant inversion :	Après inversion :
Mycélium cru.....	26 mg.	50 mg.
— chauffé.....	47 —	32 —
Matras témoin.....	traces	traces.

Le dédoublement du maltose est total.

2° *Hydrolyse du tréhalose*. — En trois jours, à la température de 36°, 25 centimètres cubes d'une solution de tréhalose à 1 p. 100 sont complètement hydrolysés par 400 milligrammes de poudre fermentaire.

3° *Hydrolyse du lactose*. — Le dédoublement du lactose à l'aide du mycélium venu sur glucose s'obtient plus difficilement que lorsqu'on s'adresse à la toile mycélienne venue sur lactose. J'ai réussi cependant à mettre en évidence une hydrolyse de 40 p. 100 du lactose primitif, après cinq jours de contact du lactose avec la poudre mycélienne.

4° *Hydrolyse du mélibiose, du turanose et du manninotriose*. — Lorsqu'on met en présence du gentianose, du mélézitose et du stachyose, de menus fragments de mycélium cultivé sur glucose, l'hydrolyse faible de ces trois sucres est rapidement atteinte et le pouvoir réducteur des liquides continue à croître, preuve que le mélibiose, le turanose et le manninotriose sont attaqués à leur tour.

De cet ensemble d'expériences il résulte que le *Botrytis cinerea*, cultivé sur glucose, élabore un nombre considérable de diastases.

La question des relations entre le sucre alimentaire et la diastase sécrétée se trouve en partie résolue, puisque, en l'absence de tout aliment hydrolysable, la moisissure produit des ferments; on peut donc formuler la conclusion suivante : Pour ce qui est des sucres et des enzymes qui s'y rapportent, la présence, dans le milieu nutritif, d'un sucre donné n'est nullement indispensable pour que le mycélium élabore la diastase correspondant à ce sucre.

Une seule réserve s'impose, elle se rapporte à la quantité de diastase élaborée; j'ai constaté, par exemple, qu'à poids égal, un mycélium jeune cultivé sur saccharose hydrolyse ce

sucré plus rapidement que ne le fait le mycélium venu sur glucose.

Les faits exposés dans ce chapitre ne sont point, du reste, particuliers aux cultures sur glucose; j'ai répété, avec des mycéliums venus sur lévulose, la plupart des expériences précédentes : elles m'ont donné des résultats identiques : cultivé sur lévulose, le *Botrytis* élabore les mêmes ferments des sucres qu'en culture sur glucose. Il est à supposer qu'on aboutirait à des conclusions semblables en étudiant, au point de vue des ferments qu'ils renferment, les mycéliums venus sur la plupart des sucres directement assimilables.

II. — FERMENTS ÉLABORÉS PAR LE *BOTRYTIS CINEREA* CULTIVÉ SUR UN SUCRE HYDROLYSABLE.

Pour cette seconde partie du problème, je me suis restreint aux sucres suivants : saccharose, maltose, lactose. Ces trois bioses et les enzymes qui leur correspondent présentent entre eux des différences suffisamment accentuées pour qu'il soit permis de tirer, à la suite de cette étude, des conclusions un peu générales.

Voici les questions que je me suis posées :

1° Le *Botrytis* cultivé sur saccharose, n'ayant besoin, par conséquent, pour utiliser le sucre mis à sa disposition, que d'un seul ferment, la sucrase, spécialise-t-il à ce point son pouvoir diastasigène, qu'il ne sécrète aucune autre diastase, en particulier ni maltase, ni lactase ?

2° Un mycélium venu sur maltose, renferme-t-il, outre la maltase, de l'invertine et de la lactase ?

3° De même, la moisissure élabore-t-elle de la maltase et de l'invertine, lorsque son développement s'effectue sur liquide Raulin ne possédant, comme sucre, que du lactose ?

Dans les recherches qui suivent, je me suis adressé uniquement aux mycéliums desséchés et pulvérisés comme source de ferments, en raison des difficultés que l'on éprouve à obtenir des macérés actifs sur le lactose et sur le maltose.

1° *Diastases des cultures sur saccharose.* — Si l'on veut opérer d'une façon rigoureuse, il importe de n'employer que des

mycéliums très jeunes, à l'état de pellicule blanche, récoltés au moment où s'effectue l'inversion rapide du sucre de canne, à l'intérieur du milieu de culture. C'est alors, en effet, que la nécessité où se trouve l'organisme de sécréter une diastase déterminée peut retentir plus efficacement sur l'élaboration des autres ferments. Ce qui se passe dans la suite s'accomplit à un moment où la moisissure végète sur sucre interverti, donc sur un milieu désormais directement assimilable; la première partie de ce chapitre nous a suffisamment renseignés sur les enzymes sécrétés dans ces conditions.

Recueillons le mycélium d'une culture sur saccharose, au moment où s'achève l'intervention du sucre, et mettons-le en contact avec une solution de maltose; en trois jours, l'hydrolyse est complète.

Une expérience semblable sur le lactose m'a permis de constater qu'après quatre jours, le tiers seulement du sucre introduit avait été transformé.

2° *Diastases des cultures sur maltose et sur lactose.* — J'ai pu caractériser, à l'intérieur des mycéliums venus sur maltose ou sur lactose, les trois enzymes, invertine, maltase, lactase; il n'existe à ce point de vue, aucune différence essentielle entre les mycéliums venus sur glucose et les mycéliums obtenus en culture sur lactose ou sur maltose.

Il faut tirer de ces expériences la conclusion suivante : le besoin, pour le *Botrytis*, de sécréter une diastase déterminée, en rapport avec le sucre alimentaire, n'entraîne pas, pour cette moisissure, l'impossibilité de différencier d'autres diastases, sans rapport aucun avec l'aliment.

Pour me rendre plus exactement compte de l'élaboration, en quelque sorte nécessaire, de certaines diastases par la cellule vivante, indépendamment des besoins immédiats de l'organisme, j'ai entrepris des cultures de *Botrytis cinerea* sur milieu Raulin dont l'aliment hydrocarboné était formé à la fois de glucose et de saccharose.

On a fait déjà des expériences de ce genre. C'est ainsi que Wortmann (1), étudiant l'utilisation de l'amidon par les Bacté-

(1) Wortmann. Untersuchungen über das diastatische Ferment der Bacterien. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, VI, p. 287, 1882.

ries, a constaté que toute sécrétion d'amylo-maltase cesse, lorsque, avec l'amidon, on introduit dans le milieu de culture un autre élément hydrocarboné plus facilement assimilable, du glucose par exemple.

Dans les cultures de *Botrytis* sur mélange de saccharose et de glucose, je ne cherche pas à savoir si le sucre de canne finira par être hydrolysé, puisque j'ai établi qu'en l'absence rigoureuse de saccharose, de l'invertine est élaborée par la moisissure végétant sur un milieu pourvu seulement de glucose.

Mais il pourrait arriver que la moisissure fît un choix entre l'élément directement assimilable et celui qui requiert une hydrolyse préalable ; le glucose serait ainsi consommé en premier lieu, et le saccharose hydrolysé, alors seulement que la plante aurait besoin de s'en nourrir.

Les choses se passent tout autrement dans la réalité. J'ai constaté, en effet, que dans toutes les cultures sur mélange de saccharose et de glucose, le sucre de canne est hydrolysé dès le début et tout aussi vite qu'en l'absence complète de glucose, cela, même lorsque le saccharose est en proportion relativement faible par rapport au glucose.

CHAPITRE IV

PROBLÈMES RELATIFS A LA SPÉCIFICITÉ
DES FERMENTS DU *BOTRYTIS CINEREA*

En présence de dédoublements si nombreux opérés dans le groupe des sucres complexes par un même organisme, le *Botrytis cinerea*, on doit nécessairement se poser la question de savoir si chacun de ces ferments caractérisés dans le mycélium possède une individualité propre, ou si, au contraire, il n'existe qu'un petit nombre de ferments types, en relation non plus seulement avec un sucre déterminé, mais avec toute une catégorie de sucres apparentés par leur structure.

Ce problème de la spécificité des diastases est particulièrement délicat, car les ferments dont on se propose de déterminer le nombre nous sont profondément inconnus quant à leur nature chimique ; le seul critérium que nous ayons pour les définir est la propriété qu'ils possèdent d'hydrolyser certaines substances.

Étant donné un macéré capable d'agir sur divers corps hydrolysables, les principales méthodes que l'on ait à sa disposition pour juger du nombre des diastases présentes, consistent à faire disparaître, à atténuer notablement, ou, au contraire, à exalter, par un réactif quelconque, physique ou chimique, l'activité de ce liquide à l'égard de l'une ou l'autre des substances qu'il peut dédoubler. Selon qu'un réactif aura fait varier, dans le même sens ou dans deux sens opposés, l'action hydrolysante du liquide sur deux substances données, on en conclura que les ferments correspondant à ces deux substances sont identiques ou différents.

Il importe tout d'abord de connaître ces méthodes et de se rendre compte du degré de certitude que l'on peut attendre de chacune d'elles.

Il existe une première méthode que les auteurs appellent généralement méthode de *destruction partielle*. Elle consiste à anéantir les propriétés actives d'un macéré vis-à-vis d'une

substance donnée, en respectant son action sur les autres ; on en conclut que le réactif a détruit la diastase correspondante sans toucher aux autres ferments.

Parmi les agents physiques de destruction, la température est celui auquel on a eu plus fréquemment recours. En soumettant à des températures croissantes un liquide à nombreuses actions diastasiques, on voit ces propriétés disparaître à mesure que la température s'élève et l'on peut ainsi établir une échelle des températures fatales. Lorsque les températures mortelles sont suffisamment éloignées, il y a chance qu'on soit véritablement en présence de deux ferments distincts ; mais le plus souvent, la différence est de quelques degrés seulement ; dans ce cas, la température mortelle pour une diastase affaiblit tellement l'autre qu'elle peut à peine manifester son activité.

À la chaleur, on peut substituer d'autres facteurs physiques : la lumière, certaines radiations simples ; parfois, il suffit de laisser vieillir un liquide fermentaire pour observer la disparition de quelques-unes de ses propriétés actives, tandis que d'autres se conservent plus longtemps.

On a recours également à des réactifs chimiques : en milieu trop acétique, par exemple, l'extrait d'amandes amères perd son action sur le lactose en gardant son pouvoir hydrolysant à l'égard de l'amygdaline ; de même, la maltase est entravée dans son action par une dose de chloroforme qui ne gêne en rien le fonctionnement de la sucrase.

C'est ici également qu'il faut mentionner certains procédés par précipitation. En traitant par l'alcool un extrait de Levure actif sur le maltose et sur le saccharose, on obtient un précipité qui n'agit plus sur le maltose bien qu'il intervertisse encore le saccharose ; le ferment correspondant au maltose aurait donc été détruit au cours de la précipitation par l'alcool.

L'objection la plus sérieuse que l'on puisse formuler contre cette méthode de destruction partielle est la suivante : rien ne prouve qu'une même diastase doive répondre, dans tous les cas, d'une façon identique, à l'excitation d'un réactif donné. Soit un liquide actif sur deux substances hydrolysables A et B. Si cette double activité résulte de la présence d'un ferment

unique, il n'est pas évident que les deux systèmes de réaction : ferment + substance A, ferment + substance B, doivent être influencés de la même manière par un facteur tel que la température.

Une seconde méthode dont on fait le plus fréquent usage est la méthode dite de *comparaison*.

En présence d'un liquide exerçant une action hydrolysante sur deux corps différents, on cherche d'autres liquides qui agissent sur l'un de ces corps seulement, à l'exclusion de l'autre. Si les deux actions diastasiques ne sont pas nécessairement simultanées ; si l'on peut, dans certains cas, constater l'une en l'absence de l'autre, on en conclut qu'elles sont dues à deux ferments distincts qui se trouvent tantôt superposés, tantôt isolés dans la nature.

Un grand nombre d'applications de cette méthode sont devenues classiques. A l'époque où l'on pouvait discuter sur l'identité de la sucrase et de l'amylase, Bourquelot constatait que le *Sterigmatocystis nigra*, cultivé sur liquide Raulin, élabore, entre autres ferments, de la sucrase et de l'amylase ; le *Penicillium Duclauxi*, au contraire, végétant sur le même milieu, ne produit que de la sucrase. Duclaux tirait de ces faits la conclusion suivante : si la sucrase se confond avec l'amylase, on ne comprend pas pourquoi les deux actions sur le sucre et l'amidon, qui se trouvent superposées dans l'*Aspergillus niger*, sont dissociées dans le *Penicillium Duclauxi*.

Un autre exemple, plus typique encore, se rapporte à l'émulsine et à la lactase. L'extrait d'amandes amères hydrolyse à la fois le lactose et l'amygdaline (1) ; le Kéfir, au contraire, agit sur le lactose sans toucher aux glucosides, tandis que le liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra* attaque l'amygdaline en respectant le lactose. Il existe donc, conclut Bourquelot, dans l'extrait d'amandes amères, deux ferments distincts se rapportant l'un au lactose, l'autre aux glucosides.

C'est à l'aide de la méthode de comparaison que, plus

(1) On sait que Fischer rapportait à un seul ferment, l'émulsine, l'hydrolyse de l'amygdaline et du lactose.

récemment encore, G. Bertrand (1) a caractérisé, dans le liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra*, une nouvelle diastase : la *cellase*.

Le plus grave reproche que l'on puisse adresser à cette méthode, c'est qu'elle fait intervenir des ferments d'origine souvent très diverse; or, de plus en plus, on s'aperçoit qu'une même diastase, tout en gardant son caractère essentiel, peut offrir des divergences très accentuées selon qu'elle provient d'une source ou d'une autre. Ces divergences portent principalement sur la température optima, sur la façon de supporter l'action des antiseptiques, sur la dose de prédilection d'acide ou d'alcali.

On a constaté des différences de ce genre entre les pepsines (2), les lipases (3), les amylases (4), les sucrases (5), les émulsines (6) d'origine diverse.

Ces différences créent, évidemment, de sérieuses causes d'erreur dans l'application de la méthode de comparaison. On pourrait, il est vrai, rendre responsables de ces différences non pas le ferment lui-même mais les substances qui l'accompagnent toujours, ces matières étrangères ne restant certainement pas inertes au cours des actions variées que met en jeu la méthode de comparaison.

Cependant il semble que, dans certains cas, ces divergences dans le fonctionnement des diastases, tiennent à la nature même des ferments. C'est notamment ce que Huerre (7) a démontré pour des maltases provenant de diverses espèces de Maïs, en établissant que les caractères différentiels de ces maltases sont indépendants de la quantité d'impuretés associées aux ferments, de la réaction du milieu et de la présence d'éléments chimiques nuisibles ou utiles.

Il ne faut pas s'étonner, dès lors, que la méthode de comparaison conduise presque toujours à la multiplication des

(1) G. Bertrand. *C. R.*, CXLIX, p. 1385, 1909; *C. R.*, CL, p. 230, 1910; *C. R.*, CLI, p. 402, 1910.

(2) Wroblewski. *Zeitschr. für phys. Chemie*, XXI, p. 1, 1895.

(3) Hanriot. *C. R.*, CXXIV, p. 779, 1897.

(4) Laborde. *Ann. Inst. Pasteur*, 1897, p. 1.

(5) Fernbach. *Thèse*, Paris, p. 67.

(6) Hérissé. *Recherches sur l'émulsine. Thèse de Pharmacie*, Paris, 1899.

(7) Huerre. *Loc. cit.*, p. 38.

diastases. Étant donné un liquide agissant sur plusieurs corps, on arrive facilement à trouver d'autres sources de diastases dont l'efficacité se limite à certaines de ces substances. C'est notamment ce qui s'est présenté pour le maltose, le mélibiose et les α -glucosides. L'extrait de certaines Levures hydrolyse à la fois ces trois corps ; d'autres Levures, comme je l'ai fait remarquer précédemment, attaquent le maltose en respectant le mélibiose ; au contraire, le sérum du sang des mammifères, qui est une source très riche de maltase, n'agit pas sur les glucosides.

Si l'on applique impitoyablement la méthode de comparaison, on dira qu'à chacun de ces trois corps correspond une diastase ayant son individualité propre.

Fischer s'est ému de cette multiplication des diastases, et, dans le cas actuel, il préfère attribuer à un seul ferment, la maltase, les trois actions hydrolysantes signalées ; mais alors il admet plusieurs *espèces* de maltases, les unes agissant à la fois sur le maltose, le mélibiose et les glucosides α , les autres efficaces à l'égard du maltose seulement.

De ces deux interprétations on peut, dans l'état actuel de la science, choisir arbitrairement l'une ou l'autre.

La meilleure conclusion à tirer, à la suite de cette discussion, c'est qu'il faut user avec réserve, dans les recherches concernant la spécificité des diastases, de toute méthode qui fait intervenir des ferments de provenance différente, l'identité de ces ferments étant sujette à contestation.

La méthode des *vitesse de réaction*, imaginée par V. Henri et Larguier des Bancels (1), repose sur des considérations toutes différentes. Soit un liquide fermentaire dans lequel on soupçonne la présence de deux ferments distincts dont chacun est actif sur une substance déterminée. On fait agir ce liquide, à la même dose, sur chacune de ces substances séparément et sur le mélange des deux, en opérant, bien entendu, dans la zone où les concentrations n'exercent plus aucune influence sur la vitesse de réaction. Si les produits de dédoublement,

(1) V. Henri et Larguier des Bancels. *Journ. de Physiol. et de Pathol.* VI, p. 261, 1904.

dans le mélange, représentent la somme de ces mêmes produits dans les deux expériences simples, c'est qu'on se trouve en présence de deux ferments distincts; supposons, en effet, qu'il n'existât qu'une seule diastase; elle se partagerait, dans le mélange, entre chacune des deux substances à hydrolyser et les produits d'hydrolyse ne seraient pas plus abondants dans le mélange que dans chacune des expériences simples. Cette méthode est concluante lorsque les résultats sont positifs; lorsqu'ils sont négatifs, c'est-à-dire lorsque le mélange n'est pas plus attaqué que chacune des substances en particulier, on ne peut affirmer avec certitude qu'il n'existe qu'un seul ferment car l'objection suivante est toujours possible: dans le mélange, chacune des deux substances pourrait, par sa présence, entraver l'hydrolyse de l'autre et, de la sorte, la somme des produits de dédoublement se trouverait abaissée.

On a réuni enfin, sous l'appellation commune de *méthodes de séparation*, un certain nombre de procédés qui visent, sinon à isoler complètement les propriétés diastasiques d'un liquide à activité multiple, du moins à faire apparaître entre elles des différences assez caractérisées pour qu'on puisse les rapporter à des ferments distincts. On s'est adressé, par exemple, à la filtration, à la dialyse, au pouvoir absorbant de certaines substances, à l'entraînement par des précipités de nature diverse.

1° *La filtration*. — Lorsqu'on fait passer une diastase en solution à travers une paroi filtrante telle qu'une bougie de porcelaine, cette solution perd, en général, de ses propriétés actives, une partie du ferment se fixant à la paroi poreuse. Les diverses diastases présentent des degrés dans ce phénomène; il y a donc là un moyen très simple pour séparer deux diastases.

Évidemment, la méthode est sujette à critique lorsqu'on opère sur des ferments de provenance diverse, car alors les différences observées peuvent tenir, non pas aux diastases elles-mêmes, mais à la nature ou à la quantité des substances étrangères qui les accompagnent. Il n'y a pas lieu de faire cette réserve lorsqu'on étudie les divers enzymes d'un même liquide actif.

Ce procédé a reçu, des travaux de Holderer sur la filtration des diastases en milieu acide ou alcalin, un perfectionnement sérieux. En effet, le pouvoir filtrant des diastases variant avec la réaction du milieu, et ces variations n'étant pas semblables pour les différentes diastases, alors même que deux diastases passent de la même façon à travers filtre, en milieu neutre, il y a lieu d'espérer que, pour une réaction acide ou alcaline, il se manifestera des différences dans la filtrabilité. C'est grâce à ce procédé que G. Bertrand et Holderer (1) ont pu démontrer que, dans le liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra*, le principe actif vis-à-vis du cellose est différent de l'émulsine contenue dans le même macéré.

On peut objecter que ce procédé fait intervenir un réactif qui, en dehors de toute influence sur la filtrabilité, peut avoir un effet différent sur les deux actions diastasiques que l'on cherche à séparer ; on sait, par exemple, qu'un extrait doué d'activité sur l'amygdaline perd rapidement cette propriété en milieu alcalin. L'objection n'a plus de sens lorsqu'on a préalablement établi que le changement de réaction ne fait apparaître, entre les deux actions fermentaires, aucune différence autre que celle qui se manifeste après filtration.

2° *La dialyse*. — La dialyse peut intervenir de deux manières dans les recherches relatives à la spécificité des ferments.

Sous un premier aspect, la dialyse n'est pas autre chose qu'une méthode de filtration ; certains ferments peuvent traverser le dialyseur, d'autres sont retenus.

Le point de vue spécial à la dialyse consiste à débarrasser les diastases des divers électrolytes qui les accompagnent ; une fois le liquide actif en possession d'une conductivité électrique très faible, on essaye son activité en l'additionnant ou non d'électrolytes donnés en quantités connues. Les propriétés diastasiques d'un liquide peuvent, dans ces divers cas, subir des modifications très variables ; on s'autorise de ces modifications pour établir une distinction entre les ferments que l'on suppose correspondre à ces propriétés. Il faut n'accepter qu'avec réserve les conclusions concernant la distinction des

(1) G. Bertrand et M. Holderer. *C. R.*, CXLIX, p. 230, janvier 1910.

diastases obtenues à l'aide de cette méthode de dialyse, cela pour la raison fondamentale que voici : un même ferment peut être actif sur un sucre en l'absence de tout électrolyte et n'attaquer un autre sucre que s'il existe un électrolyte dans la solution ; pareillement, tel électrolyte peut favoriser l'action d'un ferment sur une substance donnée et ne pas influencer ou, qui plus est, retarder l'action du même ferment sur une autre substance.

3° *Les différences de diffusibilité ou de solubilité.* — Cette méthode, excellente en raison de sa simplicité, exploite les différences de diffusibilité ou de solubilité propres aux divers ferments dont on suppose l'existence dans un même liquide actif. Soit un mycélium auquel on a reconnu la propriété d'hydrolyser diverses substances : si l'on prépare, à partir de ce mycélium, le liquide fermentaire par la méthode classique, on risque d'entraîner dans ce liquide certaines diastases, à l'exclusion d'autres qui pourront n'être obtenues qu'après un broyage à fond des cellules ; et le mycélium, après ces deux traitements successifs, possédera peut-être encore des propriétés actives qui n'appartenaient ni à l'extrait mycélien ni au liquide fermentaire. Les diastases du mycélium se seront de la sorte séparées en plusieurs groupes par le seul fait de leur diffusibilité ou de leur solubilité différentes.

Évidemment ce procédé ne saurait être adopté lorsqu'il est question de comparer deux ferments d'origine différente, car rien n'est plus variable que la perméabilité des membranes chez les divers organismes ; mais s'il s'agit des ferments d'un même organisme, le fait que certaines propriétés actives des cellules se communiquent à l'eau de macération, tandis que d'autres restent localisées dans le mycélium, semble bien indiquer une différence essentielle dans la nature des enzymes qui servent de substratum à ces propriétés.

Pour élargir la méthode, on pourrait s'appliquer à varier les véhicules d'extraction. En réalité il n'y aurait à cela aucun intérêt, chaque véhicule pouvant intervenir par son action propre, indépendamment de toute question de solubilité des ferments : c'est un fait classique que les extraits chloroformés se montrent presque incapables d'hydrolyser le

maltose, bien qu'ils soient très efficaces sur le saccharose.

Il faut bien avouer que l'application de toutes ces méthodes conduit, à peu près infailliblement, à la multiplication des ferments ; aussi le catalogue des diastases s'enrichit-il fréquemment d'une nouvelle espèce, dès qu'on réussit à préparer une nouvelle substance hydrolysable.

Les considérations développées par Fischer au sujet des relations qui existent entre la structure des substances hydrolysables et celle des ferments qui les dédoublent, tendraient, au contraire, à atténuer les distinctions entre les diverses diastases en ramenant les enzymes à un petit nombre de types.

D'après les conclusions de ce savant, en effet, une diastase ne limite pas son action à un seul corps, mais son pouvoir de transformation s'étend à tous les corps homologues du premier par leur structure.

Cette hypothèse de Fischer, que le ferment s'adapte à la substance qu'il dédouble comme « la clef à la serrure », pouvait conduire à l'un ou l'autre des deux résultats suivants : ou bien on connaissait la constitution de certains corps et l'on rapportait à un seul ferment la propriété que manifestait un extrait d'hydrolyser tous ces corps ; ou bien on connaissait le ferment, c'est-à-dire qu'on l'avait exempt d'impuretés, et on déclarait identique la structure des différents corps hydrolysés par lui.

Mais pratiquement, ainsi que le fait observer Pottevin (1) dans son Mémoire : *Stéréochimie et diastases*, nous ne savons, à l'heure actuelle, ni séparer les uns des autres et isoler à l'état pur les divers ferments solubles, ni déterminer avec certitude la composition d'un glucoside. En effet, si on considère tous les dérivés du d-glucose, par exemple, ils doivent pouvoir être rangés en deux séries d'homologues, celle des composés α et celle des composés β ; or, il n'existe, en dehors des actions diastasiques, aucun caractère physique ou chimique qui permette, un glucoside étant donné, de décider si sa place est dans l'une ou dans l'autre de ces deux séries. Il faut donc renoncer à la méthode simple qui consisterait à faire agir des diastases pures

(1) Pottevin. *Ann. Inst. Pasteur*. XVII, p. 33, 1903.

sur des composés bien définis et aborder le problème par des voies détournées.

Supposons qu'on se pose la question suivante : L'hydrolyse du maltose et des dérivées du d-fructose est-elle due à un ferment unique, la maltase, ainsi que l'admettait Fischer ? Pour être en droit d'affirmer le contraire, il suffira de trouver un ou plusieurs mélanges diastasiques capables d'hydrolyser le maltose, contenant par conséquent de la maltase, et sans activité sur les dérivés du d-fructose.

C'est donc, encore une fois, à la méthode de comparaison qu'on aura recours, et l'on se heurte de nouveau à toutes les difficultés qui surgissent dès que l'on fait intervenir des ferments de source différente ; toutes les chances sont ici encore en faveur de la multiplication à outrance des ferments.

*
* *

En exploitant ce seul fait que certaines propriétés actives du mycélium de *Botrytis cinerea* sont susceptibles de se transmettre au macéré aqueux tandis que d'autres appartiennent exclusivement à la pulpe, on divise immédiatement en deux groupes les actions diastasiques propres à la moisissure, relativement aux sucres. On en conclut que l'on peut distinguer au moins deux types de ferments dans le mycélium de *Botrytis*.

Préparons un liquide fermentaire à partir de cultures sur glucose parvenues à la fin de leur développement. Nous savons, par le chapitre précédent, que ces mycéliums venus sur glucose possèdent toutes les propriétés actives des mycéliums cultivés sur les différents sucres complexes. Étudions ensuite les diverses actions diastasiques dont est capable le liquide fermentaire.

Les sucres suivants sont hydrolysés à des degrés divers : le saccharose, intégralement ; le raffinose, le stachyose, le mélézitose, jusqu'au stade inversion faible, le gentianose au delà de ce stade.

Il importe de remarquer que l'amygdaline, elle aussi, est hydrolysée par le liquide fermentaire.

Tous les autres sucres étudiés : maltose, lactose, tréhalose, mélibiose, turanose, manninotriose, résistent à l'action du liquide fermentaire.

Si, au lieu d'opérer avec le liquide fermentaire, on s'adresse à l'extrait mycélien, les résultats sont, à peu de chose près, identiques : les mêmes sucres sont hydrolysés, les mêmes restent inattaqués. Parfois, cependant, un début d'hydrolyse semble se manifester avec certains sucres que n'avait pas touchés le liquide fermentaire. Mais cette action est toujours extrêmement lente et n'aboutit jamais à un dédoublement total ; elle n'est, du reste, pas constante, les extraits, à ce point de vue, se conduisant de façon différente ; on en conçoit facilement la raison : rien n'est aussi peu comparable que deux extraits mycéliens ; leur richesse en ferments dépend à la fois de l'écrasement plus ou moins parfait des cellules, de l'âge des mycéliums, de la filtration, de tout un ensemble de causes qu'on réussit bien difficilement à égaliser dans les différentes expériences.

Prenons maintenant une poudre fermentaire préparée avec des mycéliums venus sur glucose et essayons comparativement son action sur toute la série des sucres précédemment étudiés. Elle est capable d'opérer d'abord tous les dédoublements réalisés à l'aide du liquide fermentaire ou de l'extrait mycélien ; de plus, son efficacité s'étend sur les sucres qui résistent au pouvoir hydrolysant des macérés. En effet, le maltose, le lactose, le tréhalose, le mélibiose, le turanose et le manninotriose sont hydrolysés.

Les diastases élaborées par le *Botrytis cinerea* se partagent donc, par leur diffusibilité, en deux catégories, en admettant que les diverses actions diastasiques constatées aient pour substratum des ferments de nature différente. Dans la première catégorie se placent les enzymes qui s'attaquent au saccharose, au raffinose, au gentianose, au mélézitose et au stachyose ; dans la deuxième on trouve les diastases correspondant au maltose, au lactose, au tréhalose, au mélibiose, au turanose et au manninotriose.

Cette distinction ne repose pas, du reste, sur une séparation rigoureuse des ferments ; en effet, si le liquide fermentaire est

complètement dépourvu des ferments qui, comme la maltase, la lactase, adhèrent énergiquement à la pulpe, la poudre mycélienne, même après plusieurs macérations dans l'eau, renferme encore de l'invertine et toutes les autres diastases présentes dans le liquide fermentaire. Il est presque impossible de débarrasser complètement un mycélium de la sucrase qu'il contient ; il faudrait pour cela pratiquer plusieurs épuisements successifs, au cours desquels les diastases non diffusibles seraient affaiblies sinon détruites totalement.

Mais il n'est pas nécessaire, pour conclure à l'existence de ces deux catégories de ferments, que la poudre fermentaire soit débarrassée complètement des diastases diffusibles ; il suffit de constater l'absence, dans le liquide fermentaire, de toute une série de propriétés actives dont le mycélium est en possession.

On pourrait objecter, à la rigueur, que les diastases diffusibles, telles que l'invertine, restées dans le mycélium, travaillent en présence de substances étrangères variées ; ces substances, étant les matières mêmes dont est formé le contenu cellulaire, pourraient avoir une action favorisante très prononcée ; ainsi s'expliquerait que les diastases de la poudre fermentaire pussent opérer des dédoublements dont ne sont pas capables les macérés.

Si cela était, en ajoutant au liquide fermentaire la poudre mycélienne préalablement passée à l'autoclave, on devrait rendre ce liquide capable d'effectuer tous les dédoublements opérés par la poudre mycélienne ; or, l'expérience m'a démontré que les macérés n'acquièrent, par cette addition, aucune propriété diastasique nouvelle.

Une fois établie cette division en deux catégories des diastases relatives aux sucres, il est nécessaire de rechercher si, à l'intérieur de l'un et l'autre groupe, chaque action hydrolysante est le fait d'une diastase ayant son individualité propre, ou si, au contraire, plusieurs dédoublements sont réalisés par le même enzyme.

I. DIASTASES DU PREMIER GROUPE.

Considérons, tout d'abord, les actions diastasiques du premier groupe, c'est-à-dire celles dont est capable le liquide fermentaire et qui se rapportent au saccharose, au raffinose, au gentianose, au stachyose et au mélézitose. On aperçoit immédiatement, dans ce premier groupe, quatre substances dont l'hydrolyse par le *Botrytis cinerea* présente une certaine analogie : saccharose, raffinose, stachyose et gentianose. L'analogie consiste dans ce fait que l'hydrolyse de ces quatre polyoses se traduit par le décrochement du lévulose.

Or, le dédoublement du saccharose en une molécule de lévulose et une molécule de glucose sert, depuis longtemps, à définir l'invertine. D'autre part, les premières recherches sur l'hydrolyse du raffinose aboutirent à cette constatation que l'invertine est capable de dédoubler le raffinose au moins partiellement. Comme les sources de ferment auxquelles on s'adressait, les Levures principalement, étaient constamment actives à la fois sur le saccharose et sur le raffinose, on en conclut que l'hydrolyse du raffinose et celle du sucre de canne étaient dues à un ferment unique : l'invertine.

En 1898, Bourquelot (1), après Meyer, retira de la racine fraîche de gentiane un sucre en $C^{18}H^{32}O^{16}$ qu'il nomma gentianose. Bientôt après, il en étudia le dédoublement sous l'influence des divers liquides fermentaires d'origine végétale. Il signala, entre autres conclusions, que l'invertine de Levure déterminait l'hydrolyse partielle du gentianose, caractérisée par le décrochement d'une molécule de lévulose (2).

Peu de temps après, C. Tanret (3) isolait un nouveau polysaccharide, le mannéotétrose, et constatait que l'invertine de Levure transforme ce sucre en un mélange de lévulose et de manninotriose.

Cette similitude d'action de l'invertine de Levure sur ces quatre polyoses devait attirer l'attention, et Bourquelot for-

(1) Bourquelot et Nardin. *C. R.*, CXXVI, p. 280, 1898.

(2) Bourquelot. *C. R.*, CXXVI, p. 1046, février 1898.

(3) C. Tanret. *Bull. Soc. chim.*, t. XXVII, p. 947, 1902 et t. XXIX, p. 888, 1903.

mula cette conclusion générale : « Seuls, les polysaccharides renfermant une molécule de lévulose reliée à une molécule de glucose de la même façon que dans le saccharose, sont attaqués par l'invertine, et cela avec décrochement du lévulose (1). »

L'hydrolyse du saccharose, du raffinose, du stachyose et du gentianose était donc rapportée à un ferment unique, l'invertine.

Des recherches, déjà anciennes, effectuées avec des macérations animales et sur le *raffinose* dont Loiseau (2), dès 1876, avait fixé la véritable constitution, auraient dû mettre en garde contre l'attribution sans réserve à un ferment unique, l'invertine, de l'hydrolyse de ces polyoses. En effet, en 1895, Pautz et Vogel (3) avaient constaté que la muqueuse intestinale du chien n'exerce aucune action sur le raffinose, bien qu'elle soit capable de dédoubler le saccharose ; Fischer et Niebel avaient fait des observations analogues en opérant sur la muqueuse de l'intestin grêle du cheval.

Ces recherches sur les propriétés hydrolysantes des sucs et des macérations d'origine animale se multiplièrent dans ces dernières années (4). Elles aboutirent à la constatation suivante : certaines macérations ou certains sucs digestifs d'origine animale hydrolysent à la fois le saccharose, le raffinose, le gentianose, le stachyose ; d'autres sont actives seulement sur le saccharose : les macérations d'intestin grêle de chien, par exemple, dédoublent le saccharose seulement ; le suc gastro-intestinal d'*Helix* hydrolyse, au contraire, avec la plus grande facilité, non seulement le saccharose, mais le raffinose, le gentianose et le stachyose.

On devrait, en appliquant avec rigueur la méthode de comparaison, conclure de ces faits que l'invertine de l'intestin du chien diffère spécifiquement de l'invertine des mollusques, ou que les mollusques sécrètent un ferment particulier du raffinose, du gentianose et du stachyose, qui n'existe pas dans

(1) Bourquelot et Hérissé. *C. R.*, CXXXV, p. 401, septembre 1902.

(2) Loiseau. *C. R.*, LXXXII, p. 1058.

(3) Pautz et Vogel. *Zeitsch. für Biolog.*, XXXII, p. 304, 1895.

(4) Voir à ce sujet les bibliographies particulières données précédemment et relatives au raffinose, au gentianose et au stachyose.

l'intestin du chien. Bierry (1), notamment, se range à cette seconde alternative et propose de donner le nom de *lévulopolyase* au ferment qui détermine, dans les trois polyoses, gentianose, raffinose, stachyose, le décrochement de la molécule de lévulose.

Mes recherches sur les actions fermentaires du *Botrytis cinerea* m'ont permis de constater que chaque fois qu'un macéré dédouble le saccharose, il hydrolyse également le raffinose, le stachyose et le gentianose. Il semblerait donc que l'hydrolyse de ces quatre sucres dût être rapportée à une diastase unique.

Pour résoudre le problème, j'ai appliqué au saccharose et au raffinose la méthode des vitesses de réaction. Dans la plupart des cas, ce procédé est impraticable, l'hydrolyse du raffinose étant beaucoup moins rapide que celle du saccharose. Le liquide fermentaire préparé à partir du mycélium de *Botrytis cinerea* ne présente pas cet inconvénient : j'ai donc pu disposer l'expérience de la façon suivante :

Dix matras, jaugés à 25 centimètres cubes, renferment, en solution dans le liquide fermentaire, respectivement les quantités de sucre que voici :

I	Saccharose...	500	mg.	IV	Raffinose...	500	mg.
II	— ...	1000	—	V	— ...	1000	—
III	— ...	1500	—	VI	— ...	1500	—
	VII	Saccharose.	500	+ Raffinose.	500		
	VIII	—	—	—	—		
	IX	—	1000	+	—	1000	
	X	—	—	—	—	—	

Le saccharose est donc introduit à une concentration qui varie de 20 grammes à 60 grammes par litre ; or, dans cette région, la concentration, ainsi que l'a montré V. Henri (2), n'exerce qu'une influence peu sensible sur la vitesse d'hydrolyse.

Les matras sont abandonnés à l'étuve à 37°, retirés après quatre heures de séjour et additionnés d'une goutte de soude pour arrêter l'inversion ; le dosage, effectué sur 5 centimètres cubes, fournit, pour le cuivre réduit, les quantités suivantes :

(1) Bierry. C. R., CXLVIII, p. 950, 5 avril 1909.

(2) V. Henri. Thèse de doctorat ès sciences, Paris 1903, p. 75.

I.....	142 mg.	IV.....	139 mg.
II.....	138 —	V.....	139 —
III.....	135 —	VI.....	140 —
	VII.....		143 mm.
	VIII.....		142 —
	IX.....		141 —
	X.....		142 —

La quantité de sucre hydrolysé n'est donc pas plus considérable dans les matras renfermant du saccharose et du raffinose que dans ceux qui ne contiennent que l'un ou l'autre de ces sucres. Tout se passe comme si un seul ferment agissait à la fois sur le saccharose et sur le raffinose.

La méthode des vitesses de réaction ne permet donc pas de conclure à une différence entre l'invertine et la raffino-lévulase du *Botrytis cinerea*; ce n'est pas à dire qu'on soit en droit d'affirmer l'identité de ces ferments; lorsque le procédé par les vitesses d'inversion conduit à des résultats négatifs, il est difficile, en effet, d'en tirer aucune conclusion rigoureuse. On pourrait par exemple, dans le cas actuel, alléguer une influence retardatrice du saccharose sur le système raffino-lévulase + raffinose, et réciproquement une influence retardatrice du raffinose sur le système invertine + saccharose; ainsi s'expliquerait que, malgré la présence de deux ferments, le sucre ne soit pas hydrolysé dans les matras renfermant à la fois du saccharose et du raffinose en proportion plus grande que dans les matras qui ne contiennent que l'un ou l'autre de ces sucres.

J'ai eu recours également, dans cette étude de spécificité, à la filtration du liquide actif; un liquide fermentaire, fortement efficace vis-à-vis du saccharose et du raffinose a été filtré à la trompe, à travers une bougie d'alumine; cette opération affaiblit notablement l'activité du liquide sans l'anéantir complètement.

Si la diastase hydrolysant le saccharose et le raffinose est unique, l'affaiblissement de cette diastase, après filtration, devra être sensiblement le même à l'égard du saccharose et du raffinose; si, au contraire, il existe deux ferments distincts correspondant à ces deux sucres, on peut concevoir que chacun de ces enzymes passe de façon différente à travers les parois du filtre.

On introduit le filtrat dans des matras jaugés à 25 centimètres cubes, renfermant les uns du saccharose, les autres du raffinose, à raison de 500 milligrammes. On place les matras à l'étuve à 36° durant 5 heures; après quoi on effectue les dosages sur 5 centimètres cubes. On constate un affaiblissement très notable de l'activité diastasique du liquide fermentaire; on trouve en effet :

Matras à saccharose	32 mg. de cuivre.
— à raffinose	20 — —

Toutefois la différence ne paraît pas suffisante pour que l'on puisse conclure, en toute assurance, à une distinction entre le ferment actif sur le saccharose et celui qui dédouble le raffinose.

Je n'ai pas répété ces expériences avec le gentianose et le stachyose. Jusqu'à présent, du reste, on considère qu'un ferment unique détermine l'hydrolyse partielle des trois polysaccharides, raffinose, gentianose et stachyose. Ce que j'ai établi concernant la raffino-lévulase dans ses relations avec l'invertine, peut donc être étendu à la lévulo-polyase.

Il faudrait maintenant rechercher si l'hydrolyse faible du mélézitose est le fait d'une diastase spéciale ou si elle est opérée par l'invertine. Le problème est de la plus haute importance en raison de la constitution même du mélézitose et de la façon dont s'effectue son hydrolyse partielle. Ce triose, en effet, étant formé de trois molécules de glucose, si l'invertine est capable de le dédoubler, il devient impossible d'affirmer que les seuls polysaccharides susceptibles d'être attaqués par l'invertine sont ceux qui renferment une molécule de lévulose reliée à une molécule de glucose de la même façon que dans le saccharose.

Les recherches que j'ai faites dans le but de mettre en évidence une mélézitase différente de l'invertine ne m'ont donné que des résultats négatifs. Chaque fois qu'un liquide fermentaire ou une poudre mycélienne de *Botrytis* sont actifs sur le saccharose et sur le raffinose, ils attaquent également le mélézitose. Cela n'autorise évidemment pas à conclure à l'identité de la mélézitase et de l'invertine. Seule l'expérience des

vitesse de réaction pourrait permettre de trancher la question ; or il est à peu près impossible d'y recourir ici, l'hydrolyse du mélézitose étant lente relativement au dédoublement du saccharose.

La seule conclusion générale qu'il me soit permis de formuler, à la suite de ces recherches, c'est que l'hydrolyse du saccharose, du raffinose, du gentianose, du stachyose et même du mélézitose, sous l'action du liquide fermentaire, semble devoir être attribuée à un ferment unique, l'invertine.

Il faudrait admettre dès lors, entre l'invertine des animaux supérieurs et celle des moisissures, une différence importante : l'invertine des animaux supérieurs ferait une distinction entre le saccharose et les autres polysaccharides, raffinose, gentianose, stachyose, tandis que la sucrase des moisissures, moins spécialisée, hydrolyserait, au même titre, tous ces polyoses.

Nous pouvons occasionnellement examiner les conclusions auxquelles on aboutit en considérant les enzymes comme des réactifs spécifiques de groupements d'atomes. Le cas qui se présente ici est particulièrement intéressant en raison de la ressemblance qui existe entre le saccharose, le raffinose, le gentianose et le stachyose, pour ce qui regarde le mécanisme de leur hydrolyse partielle sous l'action de l'invertine. Cette ressemblance entraîne-t-elle une identité de structure chimique ? C'est là le problème.

Bourquelot disait en 1902 : « Seuls les polysaccharides renfermant une molécule de lévulose reliée à une molécule de glucose, de la même façon que dans le saccharose, sont attaqués par l'invertine, et cela avec décrochement du lévulose. » L'auteur avait en vue les quatre polysaccharides : saccharose, raffinose, gentianose, stachyose.

A s'en tenir à la considération des ferment élaborés par les moisissures, par le *Botrytis cinerea* notamment, la proposition énoncée par Bourquelot ne saurait être accusée d'être trop générale ; on pourrait, au contraire, la trouver exclusive puisque rien ne prouve qu'on doive rapporter à une diastase différente de l'invertine l'hydrolyse partielle du mélézitose par le liquide

fermentaire de *Botrytis cinerea*; or, le mélézitose ne renferme pas de lévulose dans sa molécule.

Au contraire, lorsqu'on étudie l'action comparée de divers liquides actifs sur le saccharose, le raffinose, le gentianose, le stachyose, on se heurte à cette difficulté qu'un grand nombre de ces liquides hydrolysent le saccharose sans toucher aux trois autres polyoses.

Dès lors il faut choisir l'une ou l'autre des interprétations suivantes : ou bien les trois polysaccharides, raffinose, gentianose, stachyose, n'ont pas la même constitution que le saccharose, ou bien le ferment qui les hydrolyse est différent de celui qui dédouble le saccharose ; tout au moins, il y a lieu de distinguer deux espèces d'invertines, l'une se rapportant au saccharose seulement, l'autre active à la fois sur les quatre polysaccharides.

Le fait que les liquides actifs sur le raffinose le sont également sur le gentianose et sur le stachyose donne à penser que ces deux polysaccharides ont même structure que le raffinose pour ce qui est de l'union du lévulose au reste de la molécule.

Mais il suffirait qu'on signalât un liquide fermentaire capable d'hydrolyser le raffinose seulement, à l'exclusion du gentianose et du stachyose pour que l'identité de structure de ces trois polysaccharides fût remise en question.

On comprend avec quelle réserve il faut conclure de la similitude des actions diastasiques à l'identité de constitution des corps hydrolysés ; d'autant plus qu'il est difficile de se rendre compte si les différences constatées dans l'activité de deux invertines d'origine diverse tiennent au ferment lui-même ou aux substances étrangères qui l'accompagnent toujours.

II. — DIASTASES DU SECOND GROUPE.

Ces diastases seraient les suivantes si chacune d'elles possédait son individualité : maltase, lactase, tréhalase, mélibiase, turanase, manninotriase.

L'étude de ces enzymes, au point de vue de leur spécificité, est rendue difficile par l'obligation où l'on se trouve de n'opérer qu'avec les poudres mycéliennes ; de ce chef, la séparation

des diastases par la température est rendue impossible; on ne peut pas davantage appliquer la méthode des vitesses de réaction, les quantités de substances hydrolysées étant proportionnelles à la concentration.

1° *Spécificité de la maltase et de la lactase.* — Plusieurs des enzymes énumérés sont généralement considérés comme parfaitement distincts. Ainsi en est-il de la maltase et de la lactase; le liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra*, par exemple, renferme de la maltase sans trace de lactase.

Ces diastases, présentes toutes deux dans le mycélium de *Botrytis*, se distinguent nettement par les caractères suivants: tout d'abord l'action des poudres mycéliennes est beaucoup plus énergique sur le maltose que sur le lactose; d'autre part, les antiseptiques ne se conduisent pas de la même manière vis-à-vis des deux diastases; le toluène, par exemple, permet à la fois l'hydrolyse du maltose et celle du lactose; le fluorure de sodium, au contraire, retarde notablement l'action de la lactase, sans entraver l'hydrolyse du maltose; enfin, et cette raison est beaucoup plus décisive, les mycéliums, en vieillissant, perdent facilement leur propriété d'hydrolyser le lactose tout en restant actifs sur le maltose.

On est donc en droit de considérer la maltase et la lactase élaborées par le *Botrytis*, comme deux ferments distincts.

2° *Rapports de la tréhalase avec la lactase et la maltase.* — La tréhalase diffère spécifiquement de la lactase, il n'existe à ce sujet aucune contestation; j'ai souvent constaté, du reste, que des mycéliums ayant perdu, à la suite d'un traitement préalable, toute action sur le lactose, gardaient leur efficacité sur le tréhalose aussi bien que sur le maltose.

Il m'a été, au contraire, impossible de distinguer la tréhalase de la maltase. Ni l'un ni l'autre enzyme ne passe dans les macérés; d'ailleurs, chaque fois qu'une poudre mycélienne de *Botrytis* dédouble le maltose, elle provoque également l'hydrolyse du tréhalose; pour ces raisons, il est permis de penser que la maltase et la tréhalase du *Botrytis cinerea* ne sont qu'un seul et même ferment. Fischer (1) et Bourquelot (2) ont du reste

(1) Fischer. *Ber. d. d. chem. Gesells.*, XXVIII, p. 1429, 1895.

(2) Bourquelot. *C. R.*, CXVI, p. 826.

rapporté à la maltase l'hydrolyse du tréhalose. Cependant Went est arrivé à une conclusion différente : d'après lui, le liquide nutritif de *Monilia sitophila* cultivé sur tréhalose dédouble le maltose seulement, à l'exclusion du lactose ; la maltase qu'il renferme est donc inefficace vis-à-vis du tréhalose.

3° *Relations entre la lactase et l'émulsine.* — Depuis que Fischer (1) a signalé, en 1894, ce fait que l'émulsine des amandes dédouble le sucre de lait, les auteurs qui se sont occupés soit de la lactase, soit de l'émulsine, se sont souvent posé le problème des relations existant entre ces deux ferments. Après avoir affirmé nettement qu'une seule et même diastase, l'émulsine, est active à la fois sur l'amygdaline et le lactose, Fischer, à la suite de nouvelles expériences, conçoit des doutes et finalement se demande si l'émulsine des amandes n'est pas un mélange de plusieurs diastases.

En 1895 (2) Bourquelot signalait qu'un échantillon d'émulsine d'amandes préparée par lui et conservée depuis un certain temps au laboratoire présentait une action très efficace sur l'amygdaline sans aucune activité vis-à-vis du lactose.

La même année, Bourquelot et Hérissé (3) montraient que l'émulsine retirée du *Sterigmatocystis nigra* et d'autres champignons, très active sur l'amygdaline, se montre incapable d'hydrolyser le lactose.

En 1899, Hérissé (4) répète les expériences de Fischer et constate comme lui que l'émulsine des amandes hydrolyse le lactose. Par contre, ni le liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra*, ni le suc de *Polyporus sulfureus* n'ont d'action sur le lactose.

Hérissé conclut, de ces faits, qu'il existe plusieurs espèces de ferments du genre émulsine ; en particulier que l'émulsine des amandes et l'émulsine des champignons sont deux espèces différentes, la première possédant seule la propriété d'attaquer le lactose. Il appuie, du reste, cette distinction sur d'autres considérations : glucosides hydrolysés par l'émulsine du *Sterigmatocystis* et non par l'émulsine d'amandes, différence

(1) Fischer. *Ber. d.d. chem. Gesells.*, XXVII, p. 2991, 1894.

(2) Bourquelot. *Journ. Pharm. et Chimie* (6), II, p. 327, 1895.

(3) Bourquelot et Hérissé. *Journ. Pharm. et Chimie* (6), II, p. 445, 1895.

(4) Hérissé. *Thèse de Pharmacie*. Paris, 1899, p. 63.

dans les vitesses d'hydrolyse suivant que l'on fait agir, sur un même glucoside, l'émulsine d'amandes ou l'émulsine du *Sterigmatocystis nigra*.

D'après les recherches de Pottevin, au contraire, la lactase et l'émulsine sont deux diastases absolument distinctes. Cultivant sur lactose, à la faveur de l'artifice imaginé par Duclaux, le *Sterigmatocystis nigra*, Pottevin constate que le mycélium contient de la lactase; cette lactase, toutefois, est extrêmement peu diffusible et n'entre en solution qu'après écrasement des cellules. On se trouve, dès lors, en présence des deux données suivantes : le liquide fermentaire du *Sterigmatocystis nigra* hydrolyse l'amygdaline, mais respecte le lactose; l'extrait mycélien dédouble à la fois ces deux corps; la conclusion s'impose : le *Sterigmatocystis* différencie de l'émulsine et de la lactase; l'émulsine, plus diffusible, passe dans le liquide fermentaire; la lactase, adhérente aux contenus cellulaires, n'est mise en liberté qu'à la suite d'un broyage à fond.

La lactase et l'émulsine du *Botrytis cinerea* sont, de même, deux diastases parfaitement distinctes qui se séparent grâce à leur différence de diffusibilité.

En effet, les liquides fermentaires sont constamment actifs vis-à-vis de l'amygdaline, ils n'hydrolysent pas le lactose; les poudres mycéliennes, au contraire, dédoublent à la fois l'amygdaline et le lactose.

Reste maintenant le problème de l'individualité des ferments qui déterminent l'inversion forte des polysaccharides, raffinose, gentianose, mélézitose, stachyose, c'est-à-dire qui sont capables d'hydrolyser le mélibiose, le gentiobiose, le turanose et le manninotriose.

1° *Diastase relative au mélibiose*. — D'après Fischer, l'émulsine d'amandes, qui attaque le lactose, dédouble également le mélibiose.

Il est admis, à l'heure actuelle, que l'émulsine d'amandes hydrolyse le lactose, grâce à un enzyme spécial distinct de celui qui s'adresse à l'amygdaline.

J'ai montré, dans les pages précédentes, que l'émulsine et la lactase élaborées par le *Botrytis cinerea* sont deux ferments

irréductibles; il faut maintenant examiner si l'hydrolyse du mélibiose est attribuable à l'un ou à l'autre de ces enzymes.

Il ne saurait être question d'identifier la mélibiase et l'émulsine; en effet, le liquide fermentaire aussi bien que l'extrait mycélien de *Botrytis*, actifs sur l'amygdaline, sont inefficaces sur le mélibiose; seule, la poudre mycélienne peut déterminer le dédoublement de ce sucre.

La mélibiase et l'émulsine sont donc deux diastases distinctes.

Bourquelot est arrivé aux mêmes conclusions en opérant sur le *Sterigmatocystis nigra*; les liquides fermentaires, toujours très actifs sur l'amygdaline, respectent constamment le mélibiose, ce qui prouve que l'émulsine du *Sterigmatocystis nigra* est incapable d'hydrolyser le mélibiose.

Faudrait-il rapporter à la lactase le dédoublement du mélibiose par le mycélium de *Botrytis*? Cette solution serait d'autant plus séduisante que le mélibiose est formé, comme le lactose, de glucose et de galactose et qu'il possède comme lui une fonction aldéhydique.

De fait, je n'ai jamais réussi à préparer de poudres mycéliennes actives seulement sur l'un des deux sucres, lactose et mélibiose; chaque fois qu'un mycélium avait perdu sa faculté d'hydrolyser le lactose, il était également incapable d'agir sur le mélibiose.

Comme il est impossible de recourir à la méthode des vitesses de réaction, on ne possède, pour trancher la question, que les données, toujours incertaines et trop nettement en faveur de la distinction des ferments, que fournit la méthode de comparaison; or, cette dernière s'oppose à l'identification de la lactase et de la mélibiase; en effet, la lactase des mammifères, qui dédouble le lactose, est sans efficacité sur le mélibiose; il faut en dire autant de la lactase du Kéfir. Ces dernières considérations battent en brèche l'hypothèse de Scheibler et Mittelmeier d'après laquelle le glucose serait uni au galactose pour former le mélibiose, de la même façon qu'il l'est dans le lactose.

2° *Diastase relative au gentiobiose*. — D'après Bourquelot, l'émulsine d'amandes détermine le dédoublement du gentio-

biose. Mais ce dédoublement doit-il être attribué à l'émulsine spécifique de l'amygdaline ou à un ferment différent de l'émulsine et contenu dans l'extrait d'amandes, la lactase par exemple ?

Les résultats obtenus par le même auteur avec le *Sterigmatocystis nigra* indiqueraient qu'il s'agit de l'émulsine proprement dite puisque le liquide fermentaire de *Sterigmatocystis* qui ne contient pas de lactase réalise cependant l'hydrolyse totale du gentianose, à moins qu'une gentiobiase spécifique ne soit responsable du dédoublement du gentiobiose.

Je suis arrivé, avec le *Botrytis*, aux mêmes conclusions. La poudre mycélienne de *Botrytis* transforme facilement le gentianose en trois molécules d'hexose.

Le liquide fermentaire effectuée, bien qu'avec plus de lenteur, le même dédoublement.

Or, les deux seules diastases caractérisées avec certitude dans le liquide fermentaire sont l'invertine et l'émulsine.

Il est admis que l'invertine ne pousse pas l'inversion du gentianose au delà du stade inversion faible ; l'hydrolyse du gentiobiose doit donc être rapportée à l'émulsine.

3° *Diastases relatives au turanose et au manninotriose*. — Le liquide fermentaire est sans action sur ces deux sucres ; leur dédoublement par la poudre mycélienne n'est donc causé par aucun des enzymes contenus dans les macérés ; on ne peut, par conséquent, l'attribuer ni à l'invertine, ni à l'émulsine.

Existe-t-il, dans le mycélium, des diastases différentes de la maltase, de la lactase, de la mélibiase et spécifiques du turanose et du manninotriose ? Jusqu'à présent je n'ai pu m'en rendre compte.

Ces diastases, en tout cas, seraient, comme la lactase et la maltase, différenciées en petite quantité par le mycélium de *Botrytis*, très fragiles et strictement endocellulaires.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Je résume ici les conclusions les plus générales qui découlent de mon travail.

1° Le *Botrytis cinerea* est susceptible de végéter aux dépens d'un grand nombre de polyoses : saccharose, maltose, lactose, tréhalose, raffinose, mélézitose. Les cultures effectuées sur ces différents sucres ne présentent pas de différences morphologiques très accentuées ; après des débuts, plus ou moins rapides selon que l'hydrolyse du sucre est plus ou moins facile, la moisissure s'organise en une toile mycélienne sur laquelle se dressent le plus souvent, vers la fin de la végétation, des filaments fertiles.

2° Aucun de ces sucres n'est *directement* assimilé par la moisissure : chacun d'eux subit, antérieurement à son assimilation, une hydrolyse préalable qui le transforme en hexoses *immédiatement* utilisables.

3° Le *Botrytis* élabore divers ferments solubles se rapportant à chacun de ces polysaccharides. Dans le cas des bioses, saccharose, maltose, lactose, tréhalose, il n'intervient, évidemment, qu'une seule diastase ; avec les trioses, tels que le raffinose, deux enzymes doivent exercer successivement leur action : l'une transformant le triose en un mélange d'hexose et de biose, la seconde hydrolysant le biose en deux molécules d'hexose.

4° La présence d'un sucre donné n'est du reste pas indispensable pour que la moisissure différencie l'enzyme qui correspond à ce sucre ; ainsi le mycélium venu sur glucose contient de la sucrase, de la maltase... etc. ; de plus, au moment même où le mycélium cultivé sur saccharose intervertit le plus activement le sucre de canne alimentaire, il élabore d'autres ferments que l'invertine, la maltase par exemple.

5° Outre les bioses et les trioses énumérés et sur lesquels j'ai pu faire des cultures, d'autres sucres, tels que le gentianose, le stachyose, peuvent être hydrolysés par les enzymes du

Botrytis ; le dédoublement complet de ces polysaccharides exige l'intervention successive de deux diastases.

6° Les enzymes relatifs aux sucres peuvent se ramener à deux types, selon qu'ils sont diffusibles ou non : le type *invertine*, parfaitement diffusible, et le type *maltase*, très adhérente à la pulpe. Les ferments du type *invertine* sont ceux qui déterminent l'hydrolyse faible du raffinose, du mélézitose, du gentianose et du stachyose, auxquels il faut ajouter l'émulsine. Les ferments analogues à la maltase sont, en les supposant tous distincts : la lactase, la tréhalase, la mélibiose, et, en général, ceux qui achèvent l'inversion forte des trisaccharides et du mannéotérose.

7° Les diastases diffusibles se trouvent évidemment dans les liquides fermentaires ; au contraire, les diastases adhérentes, telles que la maltase, ne passent jamais dans les macérés ; par conséquent, pour les mettre en évidence, c'est aux poudres fermentaires qu'il faut avoir recours.

Il résulte de ceci que l'on prendrait une idée très inexacte des actions diastasiques dont est susceptible une moisissure, si l'on se bornait à examiner l'activité des liquides obtenus par macération du mycélium.

8° Les propriétés de diffusibilité ou d'adhérence, qui divisent les diastases du *Botrytis* en deux groupes, entraînent, à l'état de conséquence plus ou moins rigoureuse, des différences essentielles dans les transformations progressives du polyose alimentaire à l'intérieur du liquide de culture : de même qu'on peut distinguer deux catégories de diastases, il est possible de ramener les cultures à deux types : les cultures sur saccharose, caractérisées par la présence d'invertine dans le milieu nutritif et l'accumulation, dans ce milieu, des produits d'hydrolyse du saccharose ; les cultures sur maltose, caractérisées par l'absence rigoureuse, dans le liquide nutritif, aussi bien de la maltase que du glucose résultant de l'hydrolyse du maltose.

Les cultures sur triose peuvent offrir successivement ces deux aspects : c'est ainsi que les cultures sur raffinose présentent une première phase dans laquelle les produits d'hydrolyse, lévulose et mélibiose, apparaissent abondamment dans le

milieu, et une deuxième phase où le mélibiose est utilisé, sans que le glucose et le galactose, résultant de son dédoublement, puissent être caractérisés dans le liquide de culture.

Le type des cultures sur maltose est de beaucoup le plus général avec le *Botrytis*.

9° En ce qui concerne la spécificité des diverses diastases mises en évidence, soit dans la poudre mycélienne, soit dans le liquide fermentaire, j'arrive aux conclusions que voici :

a. L'hydrolyse des quatre polyoses : saccharose, raffinose, gentianose, stachyose, semble être le fait d'un ferment unique, l'invertine, c'est-à-dire qu'il m'a été impossible de mettre en évidence, à côté de la sucrase, une lévulo-polyase à l'activité de laquelle serait dû le dédoublement du raffinose, du gentianose et du stachyose. Que la diastase relative à ces trois polysaccharides soit l'invertine ou un autre ferment, leur hydrolyse partielle est caractérisée par le décrochement de la molécule de lévulose qui entre dans leur constitution.

b. Je n'ai pas réussi davantage à caractériser une mélézitase différente de l'invertine.

c. La maltase et la lactase sont deux diastases distinctes.

d. L'hydrolyse du tréhalose par la poudre mycélienne de *Botrytis* doit, semble-t-il, être rapportée à la maltase.

e. Le dédoublement du gentiobiose est le fait de l'émulsine.

f. La mélibiose se distingue nettement de l'émulsine ; je n'ai pu la séparer de la lactase.

g. Quant à la turanase et à la manninotriase, il n'est pas possible de les identifier avec l'émulsine ; à ne considérer que les documents fournis par le *Botrytis*, on ne trouve pas de raison de les distinguer de la maltase ou de la lactase.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages.
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. — LES CULTURES.	
Signification et technique des cultures.....	3
Cultures sur saccharose.....	5
— maltose.....	11
— raffinose.....	15
— mélézitose.....	24
— lactose.....	27
— tréhalose.....	32
CHAPITRE II. — LIQUIDES FERMENTAIRES. EXTRAITS MYCÉLIENS. POUDRES FERMENTAIRES.	
Technique.....	33
Action sur le saccharose.....	37
— maltose.....	41
— raffinose.....	53
— gentianose.....	61
— stachyose.....	64
— mélézitose.....	67
— lactose.....	68
— tréhalose.....	72
CHAPITRE III. — RELATIONS ENTRE LE SUCRE ALIMENTAIRE ET LES DIASTASES SECRETÉES.	
Diastases des cultures sur glucose.....	79
— — saccharose.....	82
— — maltose et sur lactose.....	83
CHAPITRE IV. — PROBLÈMES RELATIFS A LA SPÉCIFICITÉ DES FERMENTS DU BOTRYTIS CINEREA.	
Exposé critique des méthodes.....	85
Division des diastases en deux groupes d'après leur diffusibilité.....	94
Invertine et lévulo-polyase.....	97
Maltase, lactase et tréhalase.....	104
Lactase et émulsine.....	105
Mélibiase.....	106
Gentiobiase.....	107
Turanase et manninotriase.....	108
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	109

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

1° MINÉRALOGIE. — Phénomènes de polarisation dans le règne végétal.

2° PHYSIOLOGIE. — Les Tyrosinases végétales.

Vu et approuvé : Paris, le 25 novembre 1910.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PACÉ APPELL.

Vu et permis d'imprimer : Paris, le 25 novembre 1910.

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris

L. LIARD.

